

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

Regulación e interacciones modulares del sistema *parD* del factor de resistencia a antibióticos R1

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan López Villarejo

Directores

Ramón Díaz Orejas
Ana María Hernández Arriaga

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**Regulación e interacciones modulares del sistema *parD* del
factor de resistencia a antibióticos R1**

TESIS DOCTORAL

JUAN LÓPEZ VILLAREJO

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Regulación e interacciones modulares del sistema *parD* del
factor de resistencia a antibióticos R1**

TESIS DOCTORAL

JUAN LÓPEZ VILLAREJO

DIRECTORES

RAMÓN DÍAZ OREJAS
ANA MARÍA HERNANDEZ ARRIAGA



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Madrid, 2012

IN.- INDICES.**A.- ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS Y TÉRMINOS ANGLOSAJONES. 10****I.- INTRODUCCIÓN. 14****I.1.- Sistemas de mantenimiento de los plásmidos en la célula. 14**

I.1.1.- Plásmidos bacterianos y sistemas de conjugación y movilización. 14

I.1.2.-Sistemas de mantenimiento plasmídicos esenciales y auxiliares. 15

I.2.- Sistemas Toxina-Antitoxina (T-A). 16

I.2.1.- Características de los sistemas T-A de tipo II. 18

I.2.1.1.- Organización genética de los sistemas T-A de tipo II. 18

I.2.1.2.- Toxinas y antitoxinas de los sistemas T-A de tipo II. 19

I.2.1.3.- Regulación de los sistemas T-A de tipo II. 20

I.3.- Replicación y mantenimiento del factor de resistencia a antibióticos R1. 21

I.3.1.- El sistema de replicación y control del plásmido R1. 21

I.3.2.- El complejo de inicio de replicación. 23

I.3.3.- Los tres sistemas auxiliares de mantenimiento de R1. 25

I.3.3.1.- El sistema T-A *parD* del plásmido R1. 26

I.3.3.1.1.-Identificación y caracterización de la toxina y antitoxina del sistema. 26

I.3.3.1.2.- Regulación transcripcional y postranscripcional del sistema *parD*. 28I.3.3.1.3.- Acoplamiento entre el sistema *parD* y el módulo de replicación. 29**O.- OBJETIVOS. 32****M.- MATERIALES Y MÉTODOS. 34**

M.1.- MATERIALES.	34
M.1.1.- Reactivos y productos químicos.	34
M.1.2.- Enzimas de restricción y modificadoras de ADN.	34
M.1.3.- Tampones y soluciones.	34
M.1.4.- Medios de Cultivo.	38
M.1.5.- Plásmidos.	39
M.1.6.- Estirpes bacterianas.	42
M.1.7.- Isótopos radiactivos.	43
M.1.8.- Material autorradiográfico.	43
M.1.9.- Marcadores de masa molecular.	43
M.1.10.- Oligonucleótidos.	43
M.1.11.-Programas y aplicaciones informáticas.	46
M.2.- MÉTODOS.	47
M.2.1.- Cultivo y conservación de <i>E. coli</i>.	47
M.2.2.- Trasnformación de <i>E. coli</i>.	47
M.2.3.- Aislamiento de ADN plasmídico.	48
M.2.4.- Aislamiento de ADN genómico.	48
M.2.5.- Extracción de ARN total.	48
M.2.6.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	49
M.2.7.- Obtención de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN (RT-PCR).	49
M.2.8.- Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).	49
M.2.9.- Marcaje radiactivo del ADN.	50
M.2.10.- Electroforesis del ADN.	50
M.2.11.- Purificación de fragmentos de ADN.	50
M.2.12.- Cuantificación de ácidos nucleicos.	51

M.2.13.- Secuenciación.	51
M.2.14.- Mutagénesis del ADN.	51
M.2.14.1.- Mutagénesis con hidroxilamina.	51
M.2.14.2.- Mutagénesis dirigida.	52
M.2.15.- Rotura enzimática del ADN.	52
M.2.16.- Purificación de Kis y Kid.	52
M.2.17.- Cuantificación de proteínas.	53
M.2.18.- Ensayos de retardo en gel.	53
M.2.19.- Ensayos de protección frente a rotura por radical hidroxilo (OH[•]).	53
M.2.20.- Ensayos de actividad β-galactosidasa.	54
M.2.21.- Aislamiento de mutantes termosensibles en la resistencia a kanamicina o en la replicación del plásmido.	54
M.2.22.- Determinación del número de copias de plásmido por equivalente genómico (PCN).	54
M.2.23.- Análisis transcripcional del sistema <i>parD</i> mediante RT-qPCR.	55
R.- RESULTADOS.	58
R.1.- Secuenciación del plásmido pKN1562 del factor de resistencia a antibióticos	
R1. 58	
R.1.1. Resultados en la secuenciación y mapa genético del plásmido.	58
R.1.1.-Resumen.	59
R.2.- Acoplamiento entre módulos de replicación y sistema <i>parD</i>.	60
R.2.1.- Análisis del “fenotipo de interferencia” observado en el plásmido pKN1562: obtención de mutantes termosensibles en la resistencia a kanamicina y de replicación por mutagénesis <i>in vitro</i> con hidroxilamina.	60
R.2.2.- Caracterización de mutantes condicionales de replicación: localización de las mutaciones aisladas.	63
R.2.3.- las mutaciones <i>repA</i> ts disminuyen el número de copias del plasmido y activan transcripcionalmente el sistema <i>parD</i> .	65

R.2.4.- La activación del sistema *parD* contribuye a rescatar la eficiencia de replicación en los mutantes *repA*ts. **66**

R.2.5.- El nivel de la antitoxina Kis es el factor clave que acopla los módulos de replicación y sistema *parD* del plásmido R1. **68**

R.2.7.- Resumen. **68**

R.3.- Interacciones modulares del sistema *parD* en la región promotora-operadora (PO). 69

R.3.1.- La antitoxina Kis, pero no la toxina Kid, interacciona con la región promotora de *parD*. **69**

R.3.2.- La toxina Kid incrementa la afinidad de Kis por el promotor del sistema *parD*. **72**

R.3.3.- La antitoxina Kis y los complejos Kid-Kis interaccionan en dos regiones separadas, I y II, del promotor-operador y lo hacen más eficientemente con la región I que con la región II. **74**

R.3.4.- Análisis de las interacciones de Kid-Kis con la región I del promotor-operador de *parD* analizadas mediante Espectrometría de Masas Nativa (EMN). **80**

R.3.4.1.- La antitoxina Kis interacciona como dímero en la región promotora-operadora de *parD*. **80**

R.3.4.2.- Un exceso molar de Kid forma con Kis complejos heterohexaméricos Kid₂-Kis₂-Kid₂ en el fragmento de ADN de 30 pb que lleva la región I. **82**

R.3.4.3.- Una relación equimolar toxina:antitoxina forma complejos heterooctaméricos estables en el fragmento de ADN de 30 pb que lleva la región I. **84**

R.3.4.4.- Resumen. **85**

R.3.4.5.- Propuestas. **86**

R.3.5.- EMN de complejos de Kid-Kis con un fragmento de 174 pb que contiene la región promotora-operadora de *parD* y que incluye los sitios I y II de interacción del represor. **86**

R.3.5.1.- EMN de complejos Kid-Kis con el fragmento de 174 pb conteniendo la región promotora-operadora silvestre. **87**

R.3.5.2.- EMN de complejos Kid-Kis con el fragmento de 174 pb conteniendo la región II mutada. **89**

R.3.5.3.- EMN de complejos Kid-Kis con el fragmento de 174 pb conteniendo la región I mutada.	90
R.3.5.4.- EMN con el fragmento de 174 pb que contiene las regiones I y II mutadas.	91
R.3.5.5.- Resumen.	92
R.3.5.6.- Propuestas.	93
R.3.6.- Implicación de las regiones I y II en la regulación transcripcional <i>in vivo</i> del sistema <i>parD</i> mediante ensayos de β -galactosidasa.	93
R.3.6.1.- Actividad β -galactosidasa de los mutantes en la región II del promotor-operador del sistema <i>parD</i> .	94
R.3.6.2.- Actividad β -galactosidasa de los mutantes en la región I y en los dobles mutantes (regiones I y II mutadas) del promotor-operador <i>parD</i> .	96
R.3.6.3.- Resumen.	98
D.- DISCUSIÓN.	100
D.1.- Secuenciación de pKN1562.	100
D.2.- Acoplamiento modular entre el sistema <i>parD</i> y el módulo de replicación de R1.	100
D.2.1.- Relación entre la eficiencia de replicación del plásmido R1 y la actividad del sistema <i>parD</i> .	100
D.2.2.- La ruta de activación del sistema <i>parD</i> por replicación plasmídica ineficiente.	101
D.2.3.- Papel del acoplamiento entre replicación y el sistema <i>parD</i> .	102
D.2.4.- Las mutaciones <i>repts</i> de pKN1562.	104
D.2.4.1.- Identificación de funciones afectadas.	104
D.2.4.2.- Localización de las mutaciones en RepA sobre un modelo estructural de la proteína.	105
D.3.- Regulación transcripcional del sistema <i>parD</i>.	107
C.- CONCLUSIONES.	112
B.- BIBLIOGRAFÍA.	116
A.- ANEXOS.	129

IN.- ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Tipos de sistemas Toxina-Antitoxina.	18
Figura 2.- Organización genética de los sistemas T-A de tipo II.	19
Figura 3.- Replicón Básico de R1 y sistema auxiliar de mantenimiento <i>parD</i> .	23
Figura 4.- Modelo de interacción de un dímero de RepA con el origen de replicación <i>OriR1</i> .	24
Figura 5.- Modelo de interacción del ARN con la toxina Kid.	27
Figura 6.- Región promotora-operadora de <i>parD</i> .	28
Figura 7.- Esquema de la cuantificación de número de copias de plásmido por genoma equivalente.	55
Figura 8.- Mapa de pKN1562.	59
Figura 9.- Esquema del aislamiento de mutantes termosensibles de replicación y kanamicina.	62
Figura 10.- Palíndromes de interacción de la proteína iniciadora de replicación RepA.	64
Figura 11.- Cambios en la secuencia de aminoácidos de RepA introducidos por las mutaciones <i>repA</i> ts.	64
Figura 12.- Número relativo de copias de plásmido por genoma equivalente (PCN) y análisis transcripcional del sistema <i>parD</i> de los plásmidos analizados.	65
Figura 13.- El análisis comparativo de los efectos de mutaciones <i>repA</i> ts en los plásmidos pKN1562 y pJLV01.	67
Figura 14.- Efecto de Kid en la unión de con la región promotora de <i>parD</i> .	71
Figura 15.- Kis y Kid-Kis interaccionan con sitios específicos en el promotor-operador de <i>parD</i> .	73
Figura 16.- Interacción de Kis y del complejo Kis-Kid con las regiones I o II de <i>parD</i> .	75
Figura 17.- Interacción de Kis y de Kis-Kid con los fragmentos de ADN que contienen o la región I o la región II de <i>parD</i> .	76
Figura 18.- Kis y los complejos Kis-Kid presentan más afinidad por la region I que por la región II del promotor <i>parD</i> .	77

- Figura 19.- Kis y los complejos Kid-Kis interaccionan más eficientemente con la región I que con la región II y presenta mayor afinidad por el fragmento que contiene ambas regiones del operón *parD*. **77**
- Figura 20.- Kis y el complejo Kid-Kis interaccionan específicamente con la región I de *parD*, en el fragmento de 115 pb. **79**
- Figura 21.- Dímeros de la antitoxina Kis interaccionan con la región I del promotor-operador de *parD*. **82**
- Figura 22.- Los complejos Kid-Kis (relación molar 2:1) interaccionan con la región I de *parD*. **84**
- Figura 23.- Complejos Kid-Kis (relación molar 1:1) interaccionan eficientemente con la región I de *parD*. **85**
- Figura 24.- Análisis por EMN de los complejos Kid-Kis formados en presencia del fragmento de 174 pb conteniendo la región promotora-operadora de *parD*. **88**
- Figura 25.- Análisis por EMN de los complejos Kid-Kis formados en presencia del fragmento de 174 pb conteniendo la región promotora-operadora de *parD* conteniendo la mutación II-C6. **89**
- Figura 26.- Análisis por EMN de los complejos Kid-Kis formados en presencia del fragmento de 174 pb conteniendo la región promotora-operadora de *parD* con mutaciones en la región I (mutante I-I). **90**
- Figura 27.- Análisis por EMN de los complejos Kid-Kis formados en presencia del fragmento de 174 pb conteniendo la región promotora-operadora de *parD* con mutaciones en la región I (mutante I-I) y en la región II (mutante II-C6). **92**
- Figura 28.- Regulación del sistema *parD* en mutantes en la región II analizada mediante ensayo de actividad β -galactosidasa. **95**
- Figura 29.- Resumen de la actividad del promotor y de la desregulación del sistema *parD* en mutantes en la región II del promotor-operador, procedentes de los ensayos de actividad β -galactosidasa. **96**
- Figura 30.- Regulación del sistema *parD* en mutantes en la región I/II y I analizada mediante ensayos de actividad β -galactosidasa. **97**
- Fig. 31.- Resumen de la actividad del promotor y de la desregulación del sistema *parD* en mutantes en la región II y/o I del promotor-operador procedentes de los ensayos de actividad β -galactosidasa. **98**
- Figura 32.- Esquema resumen de la conexión entre el módulo de replicación y el sistema *parD*. **102**
- Figura 33.- Análisis transcripcional del sistema *parD* en pKN1562 libre e integrado en el cromosoma bacteriano. **103**

Figura 34.- Modelo de interacción de un dímero de RepA con el origen de replicación *oriR1*. **105**

Figura 35.- Modelo estructural de las regiones funcionales identificadas en la proteína RepA en dos orientaciones. **106**

Figura 36.- Modelo esquemático de la autorregulación transcripcional del operón *parD*. **108**

A.- ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS Y TÉRMINOS ANGLOSAJONES

A.- ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS Y TÉRMINOS ANGLOSAJONES

Å	Ångstrom
A	Absorbancia
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BrET	Bromuro de Etidio
BSA	Seroalbúmina bobvina
Cm	Cloranfenicol
CPM	Cuentas por minuto
col.	Colaboradores
DEPC	Dietilen pirocarbonato
DMS	Dimetil sulfato
dsDNA	ADN de doble cadena
EDTA	N,N,N',N'-etilendiamino tetraacetato disódico
EMN	Espectrometría de Masas Nativa
EMSA	Ensayos de retardo en gel
Fig.	Figura
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
His	Etiqueta de histidinas
IPTG	Isopropanil-b-D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase(s) (kilo par de bases)
kDa	Kilodalton(s)
km	Kanamicina
LBT	Lurina Bertani timina

min	Minutos
m/z	Masa/carga
NA	Ácido nalidíxico
ORF	Marco de lectura abierto
OH·	Radical Hidroxilo
o/n	Over Night
PAA	Poliacrilamida
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Q-sefarosa	Aminas cuaternarias-sefarosa
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
T-A	Toxina-antitoxina
Tc	Tetraciclina
TEMED	N,N,N'N'-tetrametilen-diamina
Tris	Trihidroximetil-amino-metano
U	Unidades de enzima
U.A.	Unidades de Absorbancia
UV	Ultravioleta
V	Voltios

I- INTRODUCCIÓN.

I- INTRODUCCIÓN.

I.1.- Sistemas de mantenimiento de los plásmidos en la célula.

En esta tesis se estudia el sistema toxina-antitoxin *parD* del plásmido R1, un módulo auxiliar de mantenimiento del plásmido con un doble objetivo: 1) analizar la regulación transcripcional de este sistema y 2) estudiar el acoplamiento entre este módulo auxiliar de mantenimiento, sistema *parD*, y el módulo esencial de mantenimiento del plásmido denominado replicón básico. La introducción revisa la información relevante sobre la replicación y el módulo toxina-antitoxina *parD* del plásmido R1 en el contexto general de los sistemas de mantenimiento de plásmidos bacterianos y de los objetivos de esta tesis doctoral.

I.1.1.- Plásmidos bacterianos y sistemas de conjugación y movilización.

Los plásmidos bacterianos son unidades genéticas extracomosómicas con capacidad de replicación autónoma y controlada que se mantienen establemente en las poblaciones bacterianas. Forman parte del genoma variable de los microorganismos y son dispensables pero pueden captar y luego transferir a las poblaciones bacterianas capacidades tales como la utilización de nuevos nutrientes, resistencias a antibióticos, determinantes de virulencia, módulos reguladores de crecimiento, etc., facilitando así la adaptación y supervivencia del huésped en respuesta a distintas condiciones y nichos ecológicos. Los plásmidos son moléculas de ADN de cadena doble, de estructura circular las más veces pero que también puede ser lineal. Estas unidades genéticas pueden transferirse de una bacteria donadora a otra receptora, entre cepas de una misma especie o entre especies y géneros muy diversos, mediante procesos de conjugación o de movilización. Los plásmidos conjugativos son en general de tamaño grande (60-90 kb) debido a la extensa información genética requerida para la transferencia genética y son de bajo número de copias. En esta transferencia se generan dos copias, una de ellas permanece en la bacteria donadora y otra se completa y establece en la receptora. Los plásmidos movilizables son en general más pequeños ya que utilizan para su transferencia la maquinaria proporcionada por un plásmido conjugativo co-residente y aportan exclusivamente las funciones esenciales para iniciar el proceso (Llosa y col., 2002); (Garcillan-Barcia y col., 2009). Debido a su capacidad de transferencia horizontal, los plásmidos conjugativos o movilizables pueden diseminarse y mantenerse eficientemente en las poblaciones bacterianas (Bennett, 2008); así las células que hayan perdido estos elementos genéticos, pueden recuperarlos eficientemente de otras células portadoras presentes en la población (del Solar y col., 1998), (Nordstrom, 2006).

I.1.2.-Sistemas de mantenimiento plasmídicos esenciales y auxiliares.

Los plásmidos contienen varias funciones o sistemas que permiten su mantenimiento estable en las células hospedadoras.

El sistema de mantenimiento plasmídico más importante es el proporcionado por las funciones específicas de replicación y control que portan. Éstas funciones permiten iniciar con especificidad la copia del plásmido y acoplar el proceso replicativo con la maquinaria de replicación de la célula y con el ciclo celular. Los genes de control corrigen desviaciones en la frecuencia de replicación del plásmido y determinan un número promedio de copias por célula, característico y constante, en unas mismas condiciones de crecimiento.

La pérdida de un plásmido en una célula huésped puede ocurrir durante la división celular debido a varias razones: a) La ineficiencia en la replicación y en el acoplamiento de este proceso al ciclo celular, b) La distribución estadística de las copias del plásmido entre las células hijas; ésta distribución no dirigida genera mayor número de células sin plásmido cuando el número de copias es bajo y c) la compartimentación de las copias del plásmido como consecuencia de la formación de multímeros originados por recombinación homóloga. Estos multímeros reducen el número de copias que puedan distribuirse independientemente durante la división celular favoreciendo así la aparición de “segregantes” (células hijas libres de plásmidos).

Existen distintos sistemas auxiliares de mantenimiento que corrigen estas situaciones y que incrementan el mantenimiento de los plásmidos en la población. Estos son los sistemas de partición, los sistemas de recombinación específica de sitio y los sistemas toxina-antitoxina. Estos sistemas son dispensables y aumentan la estabilidad del plásmido en la población sin modificar su número de copias.

Los Sistemas de partición, corrigen la pérdida asociada a una distribución estadística de las copias plasmídicas. Estos sistemas juegan un papel análogo al de los centrómeros cromosómicos, y posicionan el ADN cerca de los polos de la célula favoreciendo que al menos una copia del plásmido pase a cada célula hija durante la división celular (Schumacher, 2012). Uno de los primeros sistemas de partición descritos y mejor estudiado es precisamente el sistema de partición *parR parM parS* del plásmido R1 (locus *parA*) (Gerdes y col., 2010).

Los sistemas de recombinación específica de sitio resuelven en monómeros las formas catenadas y los multímeros plasmídicos originados durante la terminación aberrante de la replicación del plásmido o como consecuencia de la recombinación homóloga entre monómeros (Summers y Sherratt, 1984). Las formas diméricas replican más eficientemente que las formas monoméricas y originan células con sólo dímeros o multímeros en las que el número de copias plasmídica independientes se reduce notablemente. La formación de multímeros va asociada con una inhibición de la división celular. La decatenación de formas catenadas y la resolución de multímeros en monómeros neutraliza la compartimentalización de la población plasmídica y también el bloqueo de la división celular, contribuyendo así a la distribución efectiva de las copias durante la división celular y al mantenimiento de los plásmidos en la población. El complejo mecanismo que coordina la multimerización de plásmidos y su resolución con la división celular ha sido elucidado recientemente en el sistema Xre-cer de ColE1 (Field y Summers, 2012).

Los sistemas toxina-antitoxina (T-A) son sistemas de mantenimiento que actúan a nivel post-segregacional interfiriendo con la proliferación de células libres de plásmido; estos sistemas, que se describen con más detalle en la siguiente sección, están compuestos por

una toxina estable y una antitoxina que es inestable. En los sistemas plasmídicos el decaimiento de la antitoxina está asociado a una activación selectiva de la toxina en las células que pierden el plásmido durante la división celular; debido a ello estas células son eliminadas o se mantienen sin proliferar. El resultado es la proliferación selectiva de las células con plásmidos que portan sistemas T-A que de esta forma se mantienen establemente en las poblaciones bacterianas. Los sistemas T-A se encuentran también en los cromosomas donde la activación selectiva de la toxina regula el crecimiento o la viabilidad celular en respuesta a distintas situaciones y también puede estabilizar su permanencia y la de regiones adyacentes por un mecanismo de eliminación de “segregantes”. Para más información general sobre estos sistemas pueden consultarse las revisiones recientes que se indican: (Gerdes y col., 2005); (Buts y col., 2005); (Van Melderren y Saavedra De Bast, 2009); (Hayes y Van Melderren, 2011).

I.2.- Sistemas Toxina-Antitoxina (T-A).

Los sistemas Toxina-Antitoxina fueron identificados por primera vez en plásmidos de bajo número de copias como sistemas auxiliares de estabilidad plasmídica. Estos sistemas T-A están compuestos al menos por dos genes que codifican dos componentes: un antídoto (ARN o proteína) que es inestable y una toxina o inhibidor de proliferación que es una proteína estable. Los genes del sistema T-A están organizados en un operón en el que el gen de la antitoxina precede de manera habitual, aunque no siempre, al de la toxina (figura 2) (Gerdes, 2000). La inestabilidad de las antitoxinas es debida a la acción selectiva de RNasas o proteasas celulares y permite la activación condicional de la toxina que a su vez determina las distintas funciones de estos sistemas: estabilización de plásmidos por eliminación de segregantes (muerte pos-segregacional o PSK), repuesta a estrés nutricional y también genético, protección de la bacteria frente a infección por bacteriofagos, estabilización de regiones cromosómicas, muerte celular asociada a procesos de diferenciación y en algunos casos, contribución a la virulencia bacteriana (Van Melderren y Saavedra De Bast, 2009); (Buts y col., 2005).

En función de la naturaleza de la antitoxina estos sistemas pueden ser clasificados en tres tipos principales (figura 1);

1. Sistemas de tipo I: En estos sistemas, el gen de la antitoxina codifica un ARN antisentido que es complementario a parte del ARN mensajero de la toxina; la interacción entre los RNAs inhibe pos-transcripcionalmente la síntesis de la toxina. El primer sistema tipo I descrito y el mejor caracterizado es el sistema *hok-sok* del plásmido R1 de *E. coli* (Gerdes y col., 1986). Las toxinas de estos sistemas pueden ser pequeñas proteínas hidrofóbicas que interacciona con la membrana celular y rompe su potencial (Fozo y col., 2008) y también RNasas que inhibe la síntesis de proteínas como es el caso en el sistema *SymR-symE* (Gerdes y Wagner, 2007). La antitoxina de estos sistemas es un RNA que es inestable debido a su procesamiento por RNasas celulares (Gerdes y col., 1992); (Fozo y col., 2010). Desde la identificación de este prototipo se han encontrado otros muchos sistemas tipo I que pueden agruparse en 5 familias (Fozo y col., 2010).

2. Sistemas de tipo II: En estos sistemas el gen de la antitoxina es una proteína inestable. La inestabilidad de la antitoxina es debida a la degradación por proteasas dependientes de ATP como Lon ó ClpP (Van_Melderen y col., 1994); (Van Melderen y Aertsen, 2009). La actividad de la toxina es neutralizada por la interacción directa con su antitoxina. Estos sistemas están ampliamente extendidos en plásmidos y cromosomas de bacterias y arqueas, y son los más estudiados. Hay al menos doce familias de toxinas y más de veinte de antitoxinas (Hayes y Van Melderen, 2011); (Leplae y col., 2011). Las toxinas de estos sistemas actúan por lo general inhibiendo el crecimiento bacteriano de una manera reversible. Datos recientes indican que los sistemas TA pueden actuar sinérgicamente induciendo estados de persistencia en las poblaciones bacterianas en los que las células no crecen, disminuyen notablemente su metabolismo y se hacen más resistentes a los antibióticos. Los sistemas TA tipo II se descubrieron en plásmidos y luego en el cromosoma bacteriano. Los primeros sistemas tipo II descritos fueron el sistema *ccd* del plásmido F y el sistema *parD* del plásmido R1 sobre el que se centra nuestro trabajo y que se describe con más detalle en la siguiente sección.

3. Sistemas de tipo III: El primer miembro de este tipo de sistemas T-A fue descubierto en el plásmido críptico pECA1039 de la bacteria Gram-negativa *Erwinia carotovora* (Fineran y col., 2009) y se ha denominado *ToxIN*. En este sistema la toxina (ToxN) es una RNasa y la antitoxina (ToxI) es un pequeño ARN que interacciona con la toxina e interfiere con su actividad RNasa (Blower y col., 2009); (Blower y col., 2010). La toxina ToxN es una RNasa y se asemeja a la toxina Kid. Es posible que ambos sistemas deriven de un mismo ancestro y que la antitoxina proteica haya sido substituida durante la evolución por una RNA neutralizador o viceversa. Desde el descubrimiento del primer sistema tipo III, (*ToxIN*), un pequeño número de sistemas de este tipo han sido detectados tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas (Fineran y col., 2009). La lista se ha ampliado recientemente como resultado de un análisis bioinformático y los sistemas tipo III se han clasificados en tres familias independientes (Blower y col., 2012). Muchos de estos sistemas se activan en respuesta a la infección por bacteriófagos, inhibiendo la síntesis de proteínas y limitando así la propagación del bacteriófago en la célula infectada. Forman así parte de los sistemas Abi (*abortive infection systems*) que confieren resistencia a bacteriófagos interfiriendo con su propagación intracelular (Labrie y col., 2010).

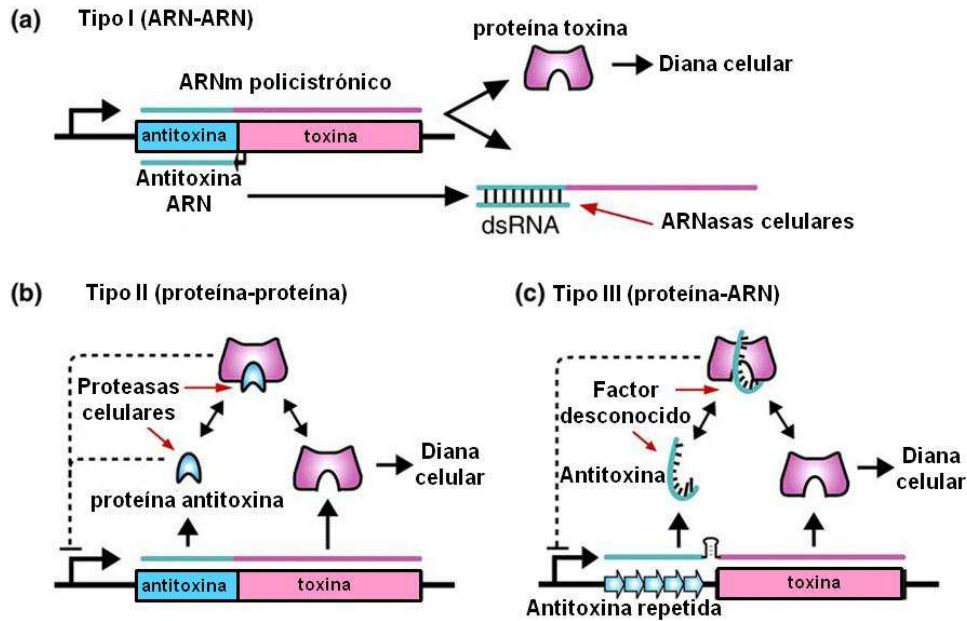


Fig. 1.- Tipos de sistemas Toxina-Antitoxina (adaptado de (Blower y col., 2011)). (A) Sistemas T-A de tipo I. La antitoxina es un ARN antisentido y la toxina es una proteína. (B) Sistemas T-A de tipo II. Tanto la antitoxina como la toxina son proteínas. La antitoxina neutraliza a la toxina por interacción con la misma. (C) Sistemas T-A de tipo III. La antitoxina es un ARN que neutraliza a la toxina (proteína) por interacción en su centro catalítico.

I.2.1.- Características de los sistemas T-A de tipo II.

I.2.1.1.- Organización genética de los sistemas T-A de tipo II.

Los sistemas T-A de tipo II se encuentran tanto en plásmidos como en cromosomas y están organizados en operones que, por regla general, están regulados a nivel transcripcional por sus componentes. La organización de estos sistemas en operones favorece la síntesis acoplada y regulada de toxinas y antitoxinas evitando así los efectos no deseados del exceso de toxina. En general, el gen de la antitoxina precede al de la toxina, pero la inversión en este orden también se ha encontrado como en el sistema *higBA* del plásmido Rts1. Los sistemas T-A suelen ser operones bicistrónicos, sin embargo, se han encontrado también excepciones a esta regla, como es el caso de los sistemas *pasABC* y $\omega\epsilon\zeta$ que están formados por tres componentes. En el sistema *pasABC*, *pasC* actúa incrementando la neutralización de la toxina *pasB* por la antitoxina *pasA*. En el sistema $\omega\epsilon\zeta$, la proteína omega actúa como un regulador global del sistema y ni la antitoxina ni la toxina actúan como represores del operón. Interessantemente, se han encontrado variaciones de este sistema con una organización estándar bicistrónica en la cual la toxina y la antitoxina regulan el operón (figura 2).

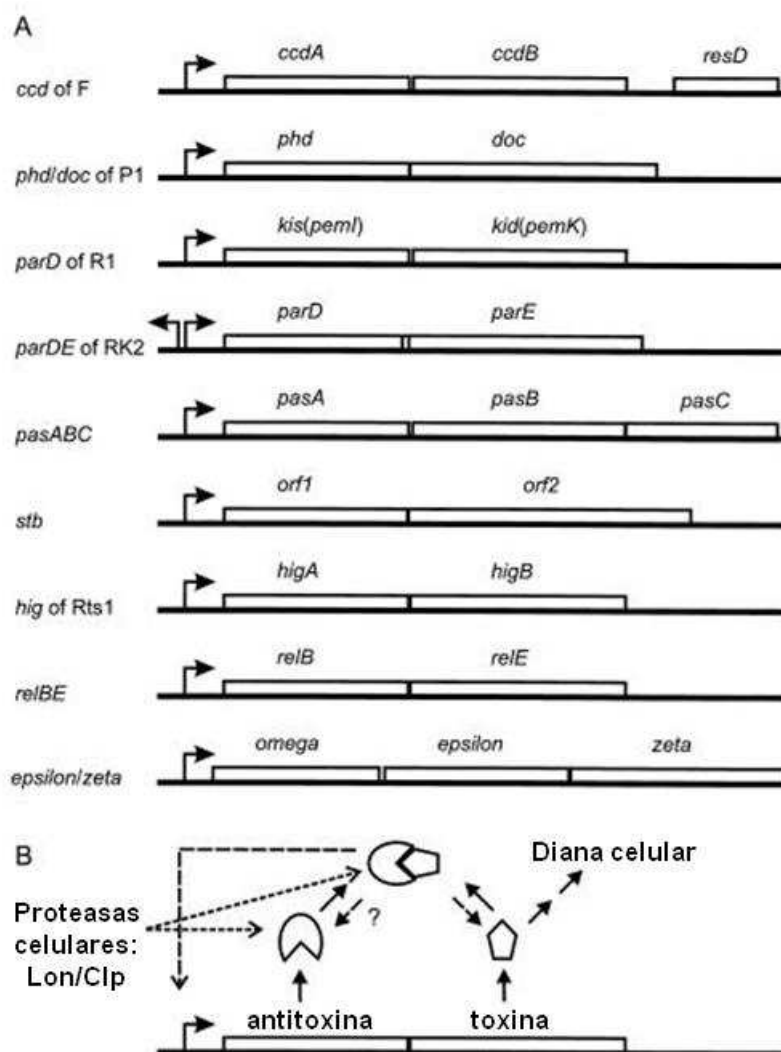


Fig. 2.- Organización genética de los sistemas T-A de tipo II (adaptado de (Gerdes, 2000)). (A) Organización genética de los sistemas T-A de tipo II en los que están compuestos, normalmente, por un operón bicistrónico en el que la antitoxina precede a la toxina. (B) La acción de la toxina es neutralizada por la antitoxina. La antitoxina es degradada por proteasas celulares originando la estabilidad diferencial entre la toxina y la antitoxina. Cuando la toxina queda libre actúa sobre su diana celular.

I.2.1.2.- Toxinas y antitoxinas de los sistemas T-A de tipo II.

Las toxinas de estos sistemas actúan intracelularmente inactivando diferentes componentes y procesos celulares: ADN girasa (CcdB y ParE), maquinaria de traducción (Doc), ARNm (Kid, HigB y Txe), síntesis de la pared celular (proteína ζ), división y morfología celular... (revisado en (Hayes y Van Melder, 2011)). Sorprendentemente, se ha encontrado una clara homología entre dos pares de toxinas con dianas ADN girasa y ARNm: CcdB/Kid y ParE/RelE (revisado en (Buts y col., 2005)). Un análisis reciente hecho con los sistemas *kis-kid* y *ccdA-ccdB* y basado en el estudio de las interacciones toxina/diana y toxina/antitoxina indica que estos sistemas evolucionaron a partir de un ancestro común en un proceso en el que las toxinas Kid o CcdB se especializaron para llegar a dianas diferentes (RNA o DNA girasa A) y las

antitoxinas lo hicieron para neutralizar a sus toxinas correspondientes. En la actualidad los dos sistemas tienen una regulación diferente y son funcionalmente independientes. Se ha propuesto que las similitudes estructurales que existen entre las proteínas equivalentes de estos sistemas y las interacciones cruzadas toxina-antitoxina, muy ineficientes pero detectables física y funcionalmente, son una huella del origen común de los dos sistemas (Smith y col., 2012). No se dispone de un análisis similar con dos sistemas de la superfamilia *relBE-ParDE*. Las toxinas de estos sistemas tienen homología estructural pero como Kid y CcdB llegan a distintas dianas: mRNA (RelE) y GyrA (parE). Es interesante subrayar que la estructura de las toxinas de las dos superfamilias son claramente diferentes. No se han identificado todavía toxinas de estas superfamilias que engloben las dos actividades de los miembros de la superfamilia. Dependiendo de su naturaleza, sus niveles intracelulares y el tiempo de duración en el cual las células son expuestas a su acción, las toxinas actúan inhibiendo el crecimiento celular o matando a las células. Estos efectos determinan la estabilización del plásmido mediado por estos sistemas y tienen otros posibles efectos relacionados con la actividad específica de sus toxinas (inducción del sistema SOS e inhibición de la replicación por CcdB y ParE o inhibición de ciertos replicones por la toxina Kid). Las antitoxinas, pueden inactivar las toxinas interfiriendo con su centro activo (inhibición de Kid por Kis) o impedir su interacción con sus dianas como ParD, Phd, la antitoxina épsilon y probablemente HigA y Txe. Algunas antitoxinas como CcdA y posiblemente otras pueden rescatar sus toxinas cuando están formando complejos con sus dianas. Inhibidores de las interacciones toxina-antitoxina podrían liberar el potencial antiproliferativo de las toxinas, por lo que la búsqueda de estos inhibidores podría permitir el desarrollo de nuevos antibióticos.

I.2.1.3.- Regulación de los sistemas T-A de tipo II.

Los sistemas toxina-antitoxina están regulados a nivel transcripcional y postranscripcional. Las antitoxinas, de los sistemas T-A de tipo II, juegan un papel principal en la regulación (represión) transcripcional de estos sistemas. Son proteínas modulares bifuncionales que contienen una región de unión al ADN (motivos LHH o RHH) unida a una región de interacción/neutralización de la toxina. Las dos regiones están claramente separadas pero relacionadas funcionalmente entre sí, ya que la antitoxina alcanza una actividad reguladora completa al interaccionar con la toxina. En los sistemas regulados por la acción coordinada de las toxinas y de las antitoxinas, las interacciones con el ADN están dirigidas por las antitoxinas. La toxina, que no interacciona con el ADN pero sí con la antitoxina, juega un doble papel en la regulación transcripcional que es dependiente de la relación toxina-antitoxina: cuando la toxina está en una relación subestequiométrica con la antitoxina, potencia la acción reguladora de esta última pero cuando está en exceso de la antitoxina interfiere con esta actividad reguladora. Este comportamiento dual, potenciador o inhibidor de la regulación, se denomina “cooperatividad condicional”. El fenómeno de la cooperatividad condicional ha sido analizado en detalle en los sistemas *ccd* (Afif y col., 2001); (Madl y col., 2006) y *phd-doc* (Magnuson y Yarmolinsky, 1998) y en los dos casos el comportamiento depende de dos sitios en las toxinas con afinidades muy diferentes por las antitoxinas. Las interacciones con el sitio de baja afinidad ocurren en exceso de la toxina y da lugar a distintas especies toxina-antitoxina que neutralizan la toxina pero que no permiten una interacción reguladora eficiente. La cooperatividad condicional tiende a restaurar los

niveles de la antitoxina desregulando el sistema cuando la toxina está en exceso y evitando así efectos no deseados; con pocas excepciones este tipo de regulación, es una huella general de estos sistemas. Una de las excepciones es la encontrada en el sistema de tres componentes *ωεζ*. En este sistema el operón es reprimido no por la antitoxina en combinación con la toxina sino por el regulador global omega. Este regulador global acopla el sistema auxiliar de mantenimiento toxina-antitoxina con el sistema de replicación y partición estabilizando máximamente el plásmido en la población bacteriana con un costo mínimo para la célula huésped (Lioy y col., 2010).

Esta tendencia a la complejidad también se han observado en el sistema *parD* o kis-kid del plásmido R1: i) la síntesis de la toxina está acoplada a la síntesis de la antitoxina y existe un procesamiento del ARN mensajero policistrónico kis-kid que incrementa la dosis transcripcional de la antitoxina (Ruiz-Echevarria y col., 1995a); ii) la estabilidad de la antitoxina, que es el principal regulador transcripcional, está regulada a su vez por la actividad selectiva de proteasas celulares dependientes de ATP. Aunque se había propuesto un papel específico de la proteasa Lon en la degradación de la antitoxina Kis, (Tsuchimoto y col., 1992) datos recientes de nuestro laboratorio cuestionan este papel. Como se ha comentado en la introducción, la menor estabilidad de la antitoxina con respecto a la toxina juega un papel importante en la estabilización del plásmido mediante la eliminación selectiva de las células que lo pierden en la división celular (Jensen y col., 1995); iii) Finalmente se ha observado una activación del sistema de estabilidad toxina-antitoxina en respuesta a una replicación ineficiente del plásmido con el resultado de una recuperación parcial de la eficiencia de replicación y de la estabilidad segregacional del plásmido (Ruiz-Echevarria y col., 1995b); (Pimentel y col., 2005). Uno de los objetivos importantes de esta tesis es la identificación del interruptor que acopla los dos módulos de mantenimiento del plásmido R1.

I.3.- Replicación y mantenimiento del factor de resistencia a antibióticos R1.

El plásmido R1 de enterobacterias, fue uno de los primeros determinantes de resistencia a antibióticos identificado y ha contribuido, de un modo pionero al conocimiento de sistemas de replicación plasmídica y su control en bacterias. Fue aislado en una infección de *Salmonella* y llamado inicialmente 1818 (Datta y Kontomichalou, 1965). Posteriormente, fue renombrado como R1 (Meynell y Datta, 1966). Es un plásmido de bajo número de copias que pertenece al grupo de incompatibilidad IncFII, que incluye otros plásmidos conjugativos con un tamaño que oscila entre 90 y 100 kb.

I.3.1.- El sistema de replicación y control del plásmido R1.

Se entiende por "replicón básico" de un plásmido la región mínima que contiene los genes de replicación y control (Kollek y col., 1978); (Molin y col., 1979). Los mini-plásmidos que incluyen el replicón básico mantienen el mismo número de copias que el plásmido parental.

La región del replicón básico de R1 tiene un tamaño aproximado de 2 kb y contiene: el origen de replicación *oriR1*, un gen estructural, *rep*, que codifica la proteína iniciadora de replicación Rep y dos genes, *copA* y *copB*, que controlan el número de copias del

plásmido (Nordstrom y Nordstrom, 1985); (Nordstrom, 2006) (figura 3). El origen de replicación del plásmido R1, *oriR1*, es una región de un tamaño de 188 pb (Masai y col., 1983), que se requiere en *cis* para su replicación. *OriR1* tiene regiones ricas en AT flanqueadas por otras ricas en GC, un sitio de interacción para la proteína iniciadora de la replicación cromosómica DnaA y otro sitio adyacente, donde interacciona la proteína iniciadora RepA. Este sitio de interacción incluye dos repeticiones invertidas separadas por 8 vueltas de DNA a las que la proteína iniciadora RepA se une con distinta afinidad (Giraldo y Diaz, 1992). Aun con la singularidad del tamaño y espaciado de las secuencias específica de interacción, *oriR1* comparte características generales con el origen de replicación de otros plásmidos que replican por un mecanismo tipo theta (Bramhill y Kornberg, 1988); (del Solar y col., 1998).

Como se ha indicado los genes *copB* y *copA* controlan la eficiencia de replicación y el número de copias del plásmido R1 modulando los niveles de la proteína iniciadora RepA. Esta proteína tiene un tamaño de 33 KDa (del Solar y col., 1998); (Rosen y col., 1980); (Yoshikawa, 1974). La transcripción del gen *repA* ocurre a partir de los promotores, *PcopB* y *PrepA*. La proteína CopB es un represor de la transcripción del promotor *PrepA*. A 5' del gen *repA* está el gen *tap*, de 185 pb, que codifica un péptido “leader” Tap, cuya síntesis se requiere para la síntesis de la proteína iniciadora RepA (Blomberg y col., 1992); a 3' del origen de replicación, *oriR1*, hay terminadores de la replicación llamados *Lter* y *Rter* (Hill y col., 1988).

El gen *copA*, es el principal controlador de replicación de R1 y el principal determinante de incompatibilidad. *copA* codifica un ARN antisentido, CopA, que se transcribe en dirección opuesta a los genes *copB* y *repA*. El ARN CopA actúa uniéndose a copT, la región complementaria de CopA en el RNAm de *repA*, inhibiendo la síntesis de la proteína RepA. El efecto sobre la síntesis de RepA es indirecto y se debe a la inhibición postranscripcional de la síntesis de la proteína Tap a la que la síntesis de RepA está acoplada. Mutaciones de cambio de sentido en la región *tap* pueden afectar la eficiencia de replicación del plásmido pero lo hace debido a que pueden cambiar la estructura del mensajero *repA* (Berzal-Herranz y col., 1991). Debido a su papel principal en el control de la replicación de R1, la inactivación de CopA o la inhibición de su síntesis conducen a una replicación descontrolada o “run-away” en la que los niveles de RepA aumentan continuamente y el número de copias del plásmido se amplifica en cada ciclo celular; por lo tanto, CopA actúa regulando la replicación de R1 acoplándola al ciclo celular. CopB por el contrario y actúa como un controlador auxiliar de replicación cuya inactivación determina un número de copias alto pero regulado. CopB es una proteína de pequeño tamaño que se ensambla como un tetrámero y que reprime la transcripción de RNAm de *repA* a partir de un promotor interno *PrepA*. De esta manera contribuye a regular los niveles de la proteína iniciadora y la frecuencia de replicación. A diferencia de CopA, un aumento de los niveles de CopB no tiene efectos sobre los niveles de RepA y en consecuencia tampoco sobre la frecuencia de inicio de replicación. Sin embargo cuando la replicación es ineficiente, la situación cambia: como *copB* se transcribe a partir de un promotor constitutivo los niveles de CopB disminuyen cuando la dosis del plásmido es baja. En esa situación la forma multimérica activa de CopB se desensambla y el represor se inactiva, elevando así los niveles de transcripción de *repA* y aumentando los niveles de la proteína iniciadora y la eficiencia de replicación. De este modo, CopB además de funcionar como un represor de la replicación de R1 funciona rescatando al plásmido de situaciones de bajo número de copias (Riise y Molin, 1986); (Nordstrom, 2006); (Paulsson y Ehrenberg, 2000). De

igual forma la bajada en la dosis génica disminuyen los niveles de CopA que también se transcribe a partir de un promotor constitutivo, favoreciendo niveles altos de RepA y una recuperación de la replicación. El juego de los dos controladores: i) limita los niveles de RepA de tal manera que la frecuencia de inicio de replicación es de una por copia del plásmido y ciclo celular, ii) determina un número de copias bajo en la célula (próximo a uno por genoma equivalente) y iii) corrige fluctuaciones en ese número de copias. RepA conjuntamente con la maquinaria replicativa de la célula huésped, promueve la replicación autónoma del plásmido a partir de *oriR1*. En resumen tanto *copA* como *copB* cooperan para mantener un número de copia bajo y controlado del plásmido R1 controlando los niveles de RepA. La estabilidad del plásmido está relacionada con su eficiencia de replicación y con su número de copias; por lo tanto, el replicón básico se puede considerar como el sistema básico de mantenimiento del plásmido (Nordstrom y Gerdes, 2003).

El sistema T-A *parD* cuya regulación se estudia en esta tesis, está acoplado al sistema de replicación y se activa cuando la replicación es ineficiente y contribuye también al rescate de la replicación (Ruiz-Echevarria y col., 1995b); (Pimentel y col., 2005). En esta tesis se analiza este acoplamiento utilizando una extensa y representativa colección de mutantes condicionales de replicación del plásmido y se investiga el interruptor que acopla los dos módulos de mantenimiento (ver sección R.2).

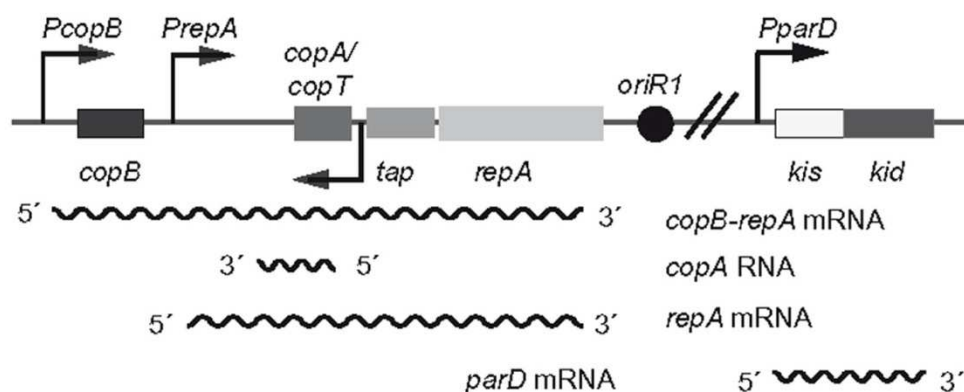


Fig 3.- Replicón Básico de R1 y sistema auxiliar de mantenimiento *parD*. El replicón básico del plásmido incluye: el origen de replicación (*oriR1*), el gen de la proteína iniciadora de la replicación (*repA*), el gen de la proteína adaptadora de traducción, (*tap*), necesaria para una eficiente traducción de RepA y los genes implicados en el control negativo de la replicación del plásmido *copA* y *copB*. Se muestran con flechas los promotores y los productos de transcripción de dichos promotores con líneas haciendo aguas. Próximo aunque no adyacente al replicón básico se encuentra el sistema toxina-antitoxina *parD*. Tomado de (Lopez-Villarejo y col., 2012).

I.3.2.- El complejo de inicio de replicación.

En esta tesis se han aislado y caracterizado parcialmente mutantes condicionales de replicación del plásmido. Los mutantes aislados puede afectar a cualquiera de las etapas de inicio de replicación, proceso que comienza en un origen de replicación único, *oriR1*, y progresa a termino unidireccionalmente a través de intermediarios del tipo *theta*. El inicio de la replicación requiere de la unión de un gran número de moléculas de proteína

RepA, quizás más de 20, a *oriR1*, de un modo similar a la unión de la proteína DnaA al origen de replicación cromosómico *oriC* (Bramhill y Kornberg, 1988). El origen de replicación de R1 contiene dos repeticiones separadas que son sitios específicos de unión de la proteína iniciadora RepA requeridos para nuclear el complejo de inicio de replicación. Las interacciones que inician el proceso de replicación se han analizado utilizando distintas aproximaciones: i) análisis de complejos RepA-*oriR1* mediante retardo en gel, ii) determinación de regiones de interacción de RepA mediante estudio de protección frente a radicales hidroxilo, iii) análisis de la replicación en extractos de *E. coli* con proteínas purificadas (RepA y DnaA), iv) utilización de una variedad de anticuerpos frente a distintas proteínas de replicación del huésped para evaluar su participación en el proceso y vii) determinación del origen y dirección de replicación mediante un análisis por microscopia electrónica de los intermedios replicativos. El modelo indica que la replicación posiblemente un dímero o un tetrámero de RepA, reconoce en *oriR1* dos pequeñas repeticiones invertidas (I y II) separadas por ocho vueltas de hélice, y forma un lazo con el ADN. Este lazo es contactado por más proteína RepA, mediante interacciones proteína-proteína, sin requerimiento de contactos específicos con el ADN (Giraldo y Diaz, 1992); el complejo pseudonucleosómico RepA-*oriR1* formado favorece la apertura de la hélice en la región rica en AT y también el ensamblamiento del complejo iniciador en el origen único la replicación; a partir de este origen la replicación del plásmido transcurre unidireccionalmente a término a través de intermedios tipo theta.

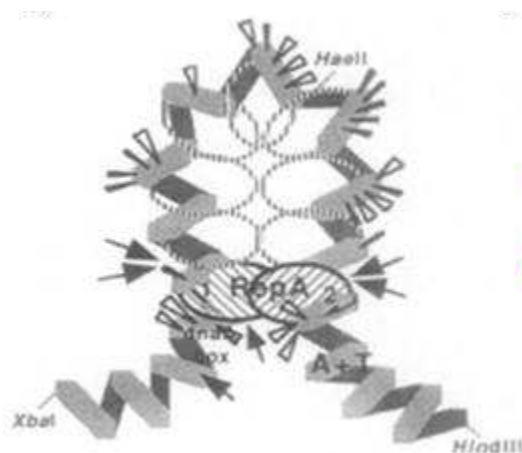


Fig. 4.- Modelo de interacción de un dímero de RepA con el origen de replicación *OriR1*. Incorporado de (Giraldo y Diaz, 1992). Dos dímeros de RepA se une a dos regiones distales del origen de replicación a través de motivos WH y forman un bucle que es rellenado por más proteína RepA, mediante interacciones proteína-proteína formando el complejo pseudonucleosómico sobre *oriR1*.

El sustrato de iniciación de la replicación es ADN circular superenrollado negativamente (Diaz y Staudenbauer, 1982); (Funnell y col., 1986). La proteína RepA actúa preferentemente en *cis* favorecido por una región entre el gen *repA* y el origen de replicación que se llama CIS (Masai y Arai, 1988). Sin embargo RepA puede activar en *trans oriR1* (Diaz y Ortega, 1984). La proteína iniciadora de la replicación cromosómica del huésped, DnaA, se requiere para el inicio del proceso *in vitro* y esta proteína accede

a la caja DnaA presente en *oriR1* por interacciones con la proteína RepA (Ortega y col., 1986). El ensamblamiento de la proteína DnaA en el complejo de iniciación pilota la entrada de otros componentes de la maquinaria de replicación cromosómica en *oriR1* promoviendo así el inicio de la replicación que es dependiente de la proteína acopladora DnaC, de la helicasa replicativa DnaB y de la primasa DnaG e independiente de la ADN Polimerasa I y de la transcripción por RNA polimerasa (Díaz y Ortega, 1984); (del Solar y col., 1998). En ausencia de la caja DnaA la interacción con RepA permite, menos eficientemente, el posicionamiento de DnaA en *oriR1* y el inicio del proceso replicativo. La replicación del plásmido R1 no requiere estrictamente de la proteína DnaA *in vivo* pero sí *in vitro*; la replicación del plásmido *in vivo* es muy ineficiente en ausencia de DnaA (Bernander y col., 1992).

El modelo disponible del complejo RepA-*oriR1* predice múltiples regiones funcionales en RepA: una interfase de dimerización, una región de interacción con el DNA, una región de interacción con DnaA u otros factores de la maquinaria replicativa del huésped y una región implicada en las interacciones RepA-RepA que forman un complejo pseudonucleosómico sobre *oriR1* (Figura 4).

El aislamiento durante esta tesis de una extensa colección de mutantes de replicación de R1 en combinación con el modelado de la proteína iniciadora RepA realizado por el Dr. Giraldo en colaboración con este proyecto, ha proporcionado nueva y valiosa información sobre los múltiples dominios funcionales de esta proteína (ver discusión D.2.4).

Finalmente, La replicación del plásmido R1 requiere síntesis de proteínas; concretamente, nuevas moléculas de RepA deben de ser sintetizadas por cada proceso de iniciación de replicación (Díaz y col., 1981); (Díaz y Ortega, 1984); (Uhlín y Nordström, 1985). Este reciclamiento implica a su vez un posible mecanismo de inactivación de la proteína iniciadora utilizada, todavía por determinar.

I.3.3.- Los tres sistemas auxiliares de mantenimiento de R1.

Hay tres sistemas auxiliares de mantenimiento en el plásmido R1 definidos por los *loci* *parA*, *parB* y *parD* (Gerdes y col., 1985); (Diago-Navarro y col., 2010). *parA* es un sistema de partición, que contribuye activamente a la distribución de las copias del plásmido durante la división celular (Nordström y col., 1980); (Møller-Jensen y col., 2002). *parB* (sistema *hok-sok*) es un sistema TA (decidir pero mantener TA o T-A) de tipo I que elimina a las células libre de plásmidos contribuyendo a la estabilidad del plásmido en la población bacteriana. La acción combinada de *parA* y *parB* incrementa la estabilidad del plásmido en cuatro órdenes de magnitud. El sistema *hok-sok* fue el primer sistema toxina-antitoxina tipo I descrito (la antitoxina es un ARN) (Gerdes y col., 1986). La toxina, Hok, es una proteína pequeña que interfiere con el potencial de membrana, mientras que su antitoxina, Sok, es un ARN antisentido que inhibe postranscripcionalmente la expresión de *hok*. Un decaimiento de la antitoxina, por endoribonucleasas permite la activación de la toxina (Gerdes y col., 1992).

En el plásmido R1, hay un segundo sistema T-A de tipo II (la antitoxina es una proteína) denominado *parD* o *kis-kid* que fue descubierto en nuestro laboratorio (Bravo

y col., 1987). Este sistema centra el estudio de esta tesis y se describe en el siguiente apartado.

I.3.3.1.- El sistema T-A *parD* del plásmido R1.

I.3.3.1.1.-Identificación y caracterización de la toxina y antitoxina del sistema.

El *locus parD* es un operón autoregulado de dos genes que codifica una toxina estable (Kid: *killing determinant*) y una antitoxina inestable (Kis: *killer supressor*), ambos de naturaleza proteica. Es por lo tanto un sistema T-A de tipo II.

El sistema *parD* se identificó en un mini-plasmid de R1 de 11 kb de bajo número de copias, denominado pKN1562, que carece de los *loci* de estabilidad *parA* y *parB*. El descubrimiento fue debido al aislamiento casual de un mutante del plásmido que interfería con el crecimiento del huésped a 42 °C. El análisis posterior indicaba que la mutación aumentaba en gran medida (3 órdenes de magnitud) la estabilidad del plásmido a la temperatura permisiva sin aumentar su número de copias que son las señas de identidad de un sistema auxiliar de estabilidad. Mediante complementación y secuenciación la mutación se localizó en el primer gen (*kis*) de un operon bicistrónico (*kis*, *kid*) próximo al replicón básico del plásmido que codificaba dos proteínas de pequeño tamaño (Bravo y col., 1987). La mutación aumentaba los niveles de las proteínas del operón, Kis y Kid, indicando que al menos el primer componente del sistema, la proteína Kis, regulaba el sistema posiblemente a nivel transcripcional. Mutaciones en el segundo componente de este sistema (*kid*), el gen de la toxina, elimina esta estabilización plasmídica así como la interferencia con el crecimiento celular asociado con la primera mutación. Estos datos indicaban el papel de Kid (“Killing determinant”, toxina del sistema) como un inhibidor de crecimiento/viabilidad celular y también el de Kis (“Killing supressor”) como la antitoxina de Kid (Bravo y col., 1988).

Desde el descubrimiento del sistema se ha progresado notablemente en la caracterización de la toxina del mismo y de su antitoxina. Estudios relativamente recientes indican que la toxina Kid es una endorribonucleasa que reconoce y corta el ARN en la secuencia 5'-UA(C/A)-3' entre la primera y la segunda base a través de un mecanismo similar al de la endorribonucleasas A y T1. Mediante la utilización de sustratos de ARN mínimos, 5'-AUACA-3' y UpA, se ha propuesto un mecanismo de corte para la toxina Kid que implica la formación de un intermediario 2':3'fosfato cíclico, característico del mecanismo de corte de las ARNasas ciclantes como las ARNasas A, α -sarcina o T1 (Lacadena y col., 1998); (Steyaert, 1997); (Kamphuis y col., 2006). Los residuos implicados en este proceso se identificaron cuando se definió un modelo de la estructura del complejo entre la toxina Kid y el sustrato no procesable 5'-AdUACA-3'. Dicho sustrato carece del 2'-OH en la ribosa necesario para la realización del corte del ARN (Figura 4) (Kamphuis y col., 2006).

Los residuos del sitio activo juegan el papel de base y ácidos catalíticos y residuo estabilizador. La estructura de la toxina ha sido obtenida por cristalografía (Hargreaves y col., 2002b) y por Resonancia Magnética Nuclear (NMR) (Kamphuis y col., 2007). Kid se estructura como un dímero con un eje de simetría binario en el que en sus

monómeros predomina una contribución de hebras β que forman un cuasi barril β que está decorado con dos regiones α -helicoidales, la más extensa C-terminal (figura 5).

En base a estudios de NMR y a datos genéticos adicionales se ha propuesto un modelo del complejo de la toxina con un RNA-diana y se han definido y evaluado residuos de la toxina que participan en la unión al sustrato (T46, S47, A55, F57, V71 y R73) y también los tres residuos D75, R73 y H17 del centro catalítico de la proteína; estos residuos jugarían respectivamente los papeles de base catalítica, ácido catalítico y residuo estabilizador (Kamphuis y col., 2006); (Diago-Navarro y col., 2009) (figura 5). El corte del RNA es más eficiente en regiones expuestas en cadena sencilla y en secuencias en las que la diana está flanqueada por una U o por dos U (Muñoz-Gomez y col., 2005); (Pimentel y col., 2005); (Kamphuis y col., 2006). La actividad RNasa de Kid es independiente del ribosoma e inhibe la síntesis de proteínas en la célula como consecuencia del procesamiento del ARNm libre. Esta RNasa también es capaz de inhibir otros procesos que son dependientes de síntesis de RNA o de proteínas tales como la replicación de ColE1 y la replicación del bacteriofago lambda respectivamente (Ruiz-Echevarria y col., 1995c).

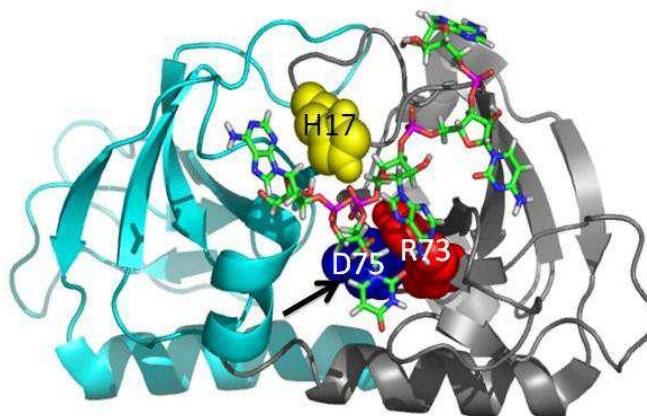


Fig. 5.- Modelo de interacción del ARN con la toxina Kid. Se muestran los dos monómeros de la proteína Kid (azul cielo y gris) y las bases del sustrato del ARN, 5'AdUACA-3', interaccionando con la proteína. También se muestran los residuos del centro catalítico: base catalítica en azul (D75), ácido catalítico en rojo (R73) y el residuo estabilizador en amarillo (H17).

La antitoxina Kis se ha modelado en complejo hetero-hexamérico con la toxina Kid por NMR ajustando datos de interacción toxina-antitoxina con la estructura de un complejo hetero-hexamérico resuelto por cristalografía para el sistema homólogo MazE-MazF (Kamphuis y col., 2007); (Kamada y col., 2003). En esta estructura, Kis y su homóloga cromosómica MazE se estructuran como un dímero a través de interacciones entre las regiones amino terminales de sus monómeros; desde este núcleo estructurado se proyectan divergentemente dos regiones C-terminales que invaden cada una la región interprotomérica de un dímero de la toxina interfiriendo con los residuos implicados en unión de la toxina al sustrato así como los residuos del sitio activo. Estas interacciones neutralizan eficientemente la capacidad de la toxina para cortar el RNA sustrato.

I.3.3.1.2.- Regulación transcripcional y postranscripcional del sistema *parD*.

Todas las células, tanto procariotas como eucariotas, son capaces de reaccionar frente a cambios que se producen en su entorno (situaciones de estrés, carencia de nutrientes, cambios de temperatura, de pH...) y en su estado fisiológico (crecimiento, desarrollo y diferenciación celular) y lo hacen ajustando convenientemente la expresión de genes específicos. La regulación de la expresión génica se puede realizar a nivel transcripcional y postranscripcional. La mutación que reveló la existencia del sistema *parD* indicaba el papel de la antitoxina en la regulación del mismo (Bravo et al 1987). Pronto se obtuvo información de que la antitoxina era el regulador específico del sistema y que ambos, la toxina y la antitoxina, actuaban coordinadamente regulando el sistema a nivel transcripcional (Ruiz-Echevarria y col., 1991). Un análisis genético posterior identificó múltiples mutaciones en la toxina y también en la antitoxina que desregulaban el sistema (Lemonnier y col., 2004). Además se encontraron mutaciones en los dos componentes del sistema que diferenciaban las funciones reguladoras y neutralizantes en la antitoxina (Santos-Sierra y col., 2002) y las actividades tóxica y co-reguladoras de la toxina indicando el carácter bifuncional de ambas proteínas. La estructura del complejo toxina-antitoxina indicaba una conexión de los dos componentes que podría ser relevante para entender su papel represor pero no permitía concluir si el complejo neutralizador era también eficiente en regulación. En este estudio se identificó el promotor del sistema y se definió el sitio de iniciación y terminación de la transcripción. El promotor-operador del sistema tiene la caja -10 extendida y el -35 a las que se une la RNA polimerasa a través del factor sigma 70 para iniciar la transcripción del operon. Contiene (sitio +1 de la figura) y contiene dos secuencias homólogas de 23 pb cada una (I y II), separadas por 33 pb. Ambas contienen una repetición interna invertida de 18 pb que es perfecta en la región I e imperfecta en la región II (Figura 6). Notablemente el sitio I solapa con la caja -10 del promotor.

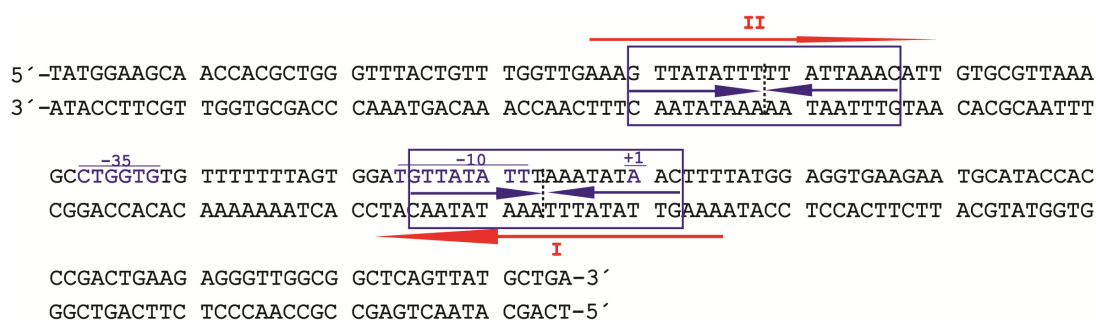


Fig 6.- Región promotora-operadora de *parD*. Se muestran: el palíndromo perfecto (I) y el imperfecto (II) con su eje de simetría con línea discontinua, el elemento -35 y -10 extendido (azul) así como también el sitio +1 de inicio de la transcripción (Ruiz-Echevarria y col., 1995c).

Por otra parte la síntesis de la toxina del sistema está acoplada traduccionalmente a la síntesis de la antitoxina y el mensajero policistrónico de *kis-kid*, es procesado para dar doble dosis transcripcional del gen de la antitoxina con respecto a la toxina (Ruiz-Echevarria y col., 1995a). Esta regulación postranscripcional favorece presumiblemente

que existan mayores niveles de antitoxina Kis que de toxina Kid (Bravo A, Tesis doctoral) y posiblemente que el sistema esté regulado a un nivel basal.

En esta tesis se analiza con detalle la interacción del represor en las repeticiones de la zona promotora-operadora, se identifica la naturaleza del complejo represor y se evalúa el papel de la dosis relativa de la toxina y la antitoxina en la neutralización de la toxina y en la formación del represor del sistema.

I.3.3.1.3.- Acoplamiento entre el sistema *parD* y el módulo de replicación.

El sistema *parD* se descubrió en nuestro grupo mediante la búsqueda infructuosa de mutantes condicionales de replicación en el miniplásmid de R1 denominado pKN1562. Posteriormente usando un derivado de pKN1562 llamado pAB174, que tiene una delección del sistema *parD*, se pudieron aislar mutantes condicionales de replicación con facilidad. Estos datos, sugirieron que el sistema *parD* interfería, directa o indirectamente, con el aislamiento de mutantes condicionales de replicación e indicaban un acoplamiento entre los módulos de replicación y del sistema toxina-antitoxina *parD*. Una posible explicación es que en los mutantes condicionales de replicación, el sistema *parD* y su toxina son activados de alguna manera, interfiriendo con el crecimiento celular y el aislamiento de esos mutantes durante el proceso de transformación.

Datos posteriores indicaban que una mutación, que reduce los niveles de RepA a nivel postraduccional sin cambiar su secuencia de aminoácidos reducía la eficiencia de replicación del plásmido. La mutación que originalmente se obtuvo en combinación con una variante deleccionada del sistema *parD* pueden rescatarse, aunque con dificultad en combinación con un sistema *parD*^{wt}. En este contexto el sistema *parD* se desregulaba contribuía a estabilizar el plásmido presumiblemente como consecuencia de una activación parcial de la toxina. Ello sugería que el sistema *parD* actuaba como un sensor de la eficiencia de replicación y contribuía a estabilizar el plásmido en condiciones de replicación ineficiente (Ruiz-Echevarria y col., 1995b). Una vez establecido que la toxina Kid tiene actividad RNasa (Kamphuis et al 2006) se encontró que el mecanismo de este rescate está relacionado con la actividad preferente de Kid sobre la diana única 5'-UUACU-3' situada en la región 3' de *copB* en el RNAm policistrónico *copB-tap-repA* (Pimentel y col., 2005): el corte de Kid en esta diana disminuye los niveles del represor CopB y aumenta los niveles de expresión del gen *repA* y en consecuencia la frecuencia de inicio de replicación del plásmido.

Aunque la actividad RNasa de la toxina Kid y su preferencia por secuencias flanqueadas por Us explicaba las consecuencias del acoplamiento (rescate de la replicación ineficiente), el determinante de este acoplamiento quedaba por identificar. Uno de los objetivos de esta tesis ha sido precisamente volver a analizar el acoplamiento modular para identificar el determinante del mismo. Para ello nos hemos valido de la capacidad del sistema para restringir el aislamiento de mutantes condicionales de replicación del plásmido (fenotipo de interferencia replicativa) y del análisis de una extensa colección de mutantes de replicación del plásmido que hemos aislado en presencia o ausencia de un sistema *parD* activo.

O.- OBJETIVOS.

O.- OBJETIVOS.

Los datos presentados anteriormente enmarcan los objetivos de este trabajo que pueden concretarse en dos principales:

1. **Estudiar la formación y estequiometría de los complejos reguladores Kid-Kis y sus interacciones con los sitios I y II del PO-*parD*.**
2. **Revisitar el acoplamiento funcional entre el replicón básico del factor de resistencia a antibióticos R1 y el sistema toxina-antitoxin *parD* con dos objetivos:**

2.1.-Caracterizar más sistemáticamente la activación del sistema en respuesta a una replicación ineficiente mediante el análisis de una extensa y nueva colección de mutantes condicionales de replicación del plásmido.

2.2.-Cuantificar y cualificar el fenotipo de interferencia replicativa y utilizarlo para obtener información sobre el determinante del acoplamiento entre los módulos replicativo y toxina-antitoxina *parD* del plásmido R1.

M.- MATERIALES Y MÉTODOS.

M.- MATERIALES Y MÉTODOS.

M.1.- MATERIALES.

M.1.1.- Reactivos y productos químicos.

Se utilizaron reactivos de las casas comerciales New England Biolabs, Sigma, Fluka, Serva, Merck, Gibco, Panreac, GE Healthcare y Roche Applied Biosciences.

M.1.2.- Enzimas de restricción y modificadoras de ADN.

Las enzimas utilizadas fueron suministradas por las firmas comerciales Biolabs, Promega, Sigma, GE Healthcare, Invitrogen, Qiagen y Roche Applied Biosciences y Ambion.

M.1.3.- Tampones y soluciones.

- Tampón de electroforesis Tris-Acetato (TAE) (1X)

Tris Base.....40 m M

Acido acético20 m M

EDTA.....2 mM

pH 9

- Tampón de electroforesis Tris-Borato (TBE) (1X)

Tris base.....50 m M

Acido Bórico.....50 m M

EDTA.....1 mM

pH 8.5

-Tampón de electroforesis MOPS (1X)

MOPS.....	20 mM
CH ₃ COONa.....	5 mM
EDTA.....	1 mM
pH 7.0	

- Tampón de electroforesis de proteínas (*Running Buffer*) (1X)

Tris Base.....	25 mM
Glicina.....	192 mM
SDS.....	0.1% (p/v)
pH 8.5	

- Tampón TE (1X)

Tris-HCl pH 7.4.....	10 mM
EDTA.....	1 mM

- Solución no desnaturizante para carga de ácidos nucleicos en geles de agarosa (10X)

Glicerol.....	50%
Xilencianol.....	0.1% (p/v)
Azul de Bromofenol.....	0.1% (p/v)
EDTA.....	10 mM

-Solución desnaturizante para carga de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida (2X)

Formamida desionizada.....	94% (v/v)
Xilencianol.....	0.025% (p/v)
Azul de Bromofenol.....	0.025% (p/v)

EDTA.....17 mM
 - Solución desnaturizante para carga de proteínas en geles de SDS-PAGE (*Loading buffer*) (5X)

Tris-ClH pH 6.8.....50 mM

SDS.....10 % (p/v)

EDTA pH 8.0.....10 mM

Glicerol.....25% (p/v)

Azul de Bromofenol.....0.5 g/l

β -mercaptoetanol.....5% (v/v)

- Tampón de elución de ADN a partir de geles de poliacrilamida (PAA) (1X)

NaCl.....200 mM

Tris-HCl pH 7.4.....20 mM

EDTA2 mM

pH 8.0

- Tampón de elución de ARN a partir de geles de poliacrilamida (1X)

NH₄Ac.....500 mM

SDS.....0.1 % (p/v)

EDTA pH 8.0.....1 mM

- Tampón de dilución de proteínas purificadas (1X)

KCl.....50 mM

HEPES.....20 mM

BSA.....100 μ g/ ml

pH 7.4

- Solución de poliacrilamida al 40% (19:1) para electroforesis de ARN y ensayos de protección frente a radical hidroxilo

Acrilamida.....380 g/l

Bisacrilamida.....20 g/l

- Solución de poliacrilamida al 30.08% (30:08) para la electroforesis de ADN de ensayos de retardo en gel (EMSA)

Acrilamida.....300 g/l

Bisacrilamida.....8 g/l

- Solución de poliacrilamida al 30% (29:1) para electroforesis de proteínas

Acrilamida.....292 g/l

Bisacrilamida.....8 g/l

- Tampón de unión para ensayos de retardo en gel

Tris-HCl pH 8.0.....70 mM

KCl.....200 mM

MgCl₂.....14 mM

NaCl.....80 mM

EDTA.....40 mM

BSA.....100 µg/ ml

Glicerol.....0.5 % (v/v)

pH 8.0

- Solución Ca⁺²/ Mg⁺² para medio M9 (100X)

CaCl₂·2 H₂O.....10 m M

MgSO₄·7 H₂O.....100 m M

- Solución de sales para medio M9 (10X)

NaPO₄H·12H₂O.....500 mM

KH₂PO₄.....220 mM

NaCl.....85 mM

NH₄Cl.....187 mM

pH 7.0

M.1.4.- Medios de Cultivo.

- Medio LBT Líquido

Bactotripton a.....10 g/l

Extracto de levadura.....5 g/l

NaCl.....5 g/l

Timina.....20 mg/l

pH 7.0

- Medio LBT sólido

Para realizar LBT sólido, se adicionó al LBT líquido agar bacteriológico (15 g/l) de la casa Pronadisa.

- Medio de cultivo (2x) TY

Tripton a.....16 g/l

Extracto de levadura.....10 g/l

NaCl.....5 g/l

pH 7.4

-Medio Mínimo M9 Líquido

Solución Ca⁺²/ Mg⁺² (100X).....10 ml/l

Vitamina B1.....10 mg/l

Solución de sales (10X).....100 ml/l

(Ver apartado solución de sales para medio M9 10x)

-Medio Mínimo M9 sólido

Para preparar medio M9 sólido se adicionó al medio M9 líquido agar bacteriológico (15 g/l) de la casa Pronadisa.

Dependiendo de los requerimientos auxotróficos de la estirpe, los medios aquí descritos anteriormente fueron suplementados con: antibióticos, azúcares, aminoácidos, vitaminas o sales a las concentraciones requeridas en cada caso.

M.1.5.- Plásmidos.

Tabla 1.- ADNs plasmídicos usados en este trabajo.

Nombre	Parental	Descripción	Marcador de selección	Referencia
pBR322	pMB9	pMB9	Ap, Tc	(Bolívar y col., 1977)
pAB24	pKN1562 y pBR322 (pMB9)	<i>parD</i> +	Tc	(Bravo y col., 1987)
pUC18	pMB9	pMB9	Ap	(Yanisch-Perron y col., 1985)
pKN1562	R1 drd-19	Miniderivado de R1, <i>repA</i> +, <i>parD</i> +	Km	(Molin y col., 1979)
pUCSau3a	pUC18	pUC18 con el fragmento <i>Sau3a</i> de <i>parD</i> (que incluye el operador) insertado en la diana <i>Bam</i> H1	Ap	Dra.Mª Jesus Ruiz-Eichevarria (No publicado)
pAB17	pKN1562	<i>parD</i> (<i>Kis18</i> , <i>kid</i> +)	Km	(Bravo y col., 1987)
pAB174	pAB17	Delección de <i>parD</i>	Km	(Bravo y col., 1987)
pRG-his-KisKid	pRG-recA-NHis, pMB9	Vector de expresión, <i>parD</i> +	Ap	Dra. Rosario Sabariegos-Jareño (no publicado)
pJLV01	pKN1562	<i>repA</i> +, <i>parD</i> +, <i>kidD75E</i>	Km	Este trabajo

pJLV01-R55H	pJLV01	<i>repAR55H, kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pJLV01-D84N-R221H	pJLV01	<i>repAD84N-R221H, kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pJLV01-A52V	pJLV01	<i>repAA52V, kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pJLV01-E260K	pJLV01	<i>repAE260K, kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pJLV01-A71V	pJLV01	<i>repAA71V, kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pJLV01-A120V	pJLV01	<i>repAA120V, kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pJLV01-P17S	pJLV01	<i>repAP17C, kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pJLV01-A87T	pJLV01	<i>repAA87T, kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pJLV01-T151I	pJLV01	<i>repA T151I, kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pJLV01-OriR1	pJLV01	Mutación en el origen de replicación, <i>kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pJLV01-W175Ambar	pJLV01	<i>repAW175Ambar, kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pJLV01-R249C-R264H	pJLV01	<i>repAR249C-R264H, kidD75E</i>	Km	Este trabajo
pAB174-P64S	pAB174	<i>repAP64S</i> Deleción de <i>parD</i>	Km	Este trabajo
pAB174-R268C	pAB174	<i>repA R268C</i> Deleción de <i>parD</i>	Km	Este trabajo
pAB174-Q133Ambar	pAB174	<i>repAQ133Ambar</i> Deleción de <i>parD</i>	Km	Este trabajo
pAB174-W175Ambar-S278N	pAB174	<i>repAW175Ambar-S278N</i> Deleción de <i>parD</i>	Km	Este trabajo
pAB174-A52V	pAB174	<i>repAA52V</i> Deleción de <i>parD</i>	Km	Este trabajo
pAB174-G248E	pAB174	<i>repAG248E</i> Deleción de <i>parD</i>	Km	Este trabajo
pAB174-R55H	pAB174	<i>repAR55H</i> Deleción de <i>parD</i>	Km	Este trabajo
pAB174-L212F	pAB174	<i>repAL212F</i> Deleción de <i>parD</i>	Km	Este trabajo
pAB174-Q6P	pAB174	<i>repAQ6P</i> Deleción de <i>parD</i>	Km	Este trabajo
pAB174-OriR1	pAB174	Mutación en el origen de replicación, Deleción de <i>parD</i>	Km	Este trabajo
pKN1562-	pKN1562	Miniderivado de R1,	Km	Este trabajo

Q209Ambar		<i>repAQ209Ambar, parD+</i>		
pKN1562-A52S	pKN1562	Miniderivado de R1, <i>repAA52S, parD+</i>	Km	Este trabajo
pKN1562-A54T	pKN1562	Miniderivado de R1, <i>repAA54T, parD+</i>	Km	Este trabajo
pKN1562-R70T	pKN1562	Miniderivado de R1, <i>repAR70T, parD+</i>	Km	Este trabajo
pKN1562-Q185Ambar	pKN1562	Miniderivado de R1, <i>repAQ185Ambar, parD+</i>	Km	Este trabajo
pKN1562-R55H	pKN1562	Miniderivado de R1, <i>repAR55H, parD+</i>	Km	Este trabajo
pKN1562-T151I	pKN1562	Miniderivado de R1, <i>repAT151I, parD+</i>	Km	Este trabajo
pMLM132	pMLM1	<i>PparD::lacZ</i>	Cm	(Santos-Sierra y col., 2003)
pMLM132-II-I	pMLM132	Mutación en la región II del promotor <i>parD</i> <i>PparD::lacZ</i>	Cm	Este trabajo
pMLM132-II-D	pMLM132	Mutación en la región II del promotor <i>parD</i> <i>PparD::lacZ</i>	Cm	Este trabajo
pMLM132-II-ID	pMLM132	Mutación en la región II del promotor <i>parD</i> <i>PparD::lacZ</i>	Cm	Este trabajo
pMLM132-II-DC	pMLM132	Mutación en la región II del promotor <i>parD</i> <i>PparD::lacZ</i>	Cm	Este trabajo
pMLM132-II-C6	pMLM132	Mutación en la región II del promotor <i>parD</i> <i>PparD::lacZ</i>	Cm	Este trabajo
pMLM132-II-IC	pMLM132	Mutación en la región II del promotor <i>parD</i> <i>PparD::lacZ</i>	Cm	Este trabajo
pMLM132-II-DN	pMLM132	Mutación en la región II del promotor <i>parD</i> <i>PparD::lacZ</i>	Cm	Este trabajo
pMLM132-II-IDN	pMLM132	Mutación en la región II del promotor <i>parD</i> <i>PparD::lacZ</i>	Cm	Este trabajo
pMLM132-II-IDC	pMLM132	Mutación en la región II del promotor <i>parD</i> <i>PparD::lacZ</i>	Cm	Este trabajo
pMLM132-I	pMLM132	Mutación en la región I del promotor <i>parD</i> <i>PparD::lacZ</i>	Cm	Este trabajo
pMLM126	pLNBAD	<i>pLNBAD::kis</i>	Cm	(Lemonnier y col., 2004)

pMLM126	pLNBAD	pLNBAD:: <i>kis</i>	Cm	(Lemonnier y col., 2004)
---------	--------	---------------------	----	--------------------------

M.1.6.- Estirpes bacterianas.

Tabla 2.- Estirpes bacterianas empleadas en la realización de esta tesis.

Estirpe	Genotipo	Referencia
OV2	F, <i>leu</i> , <i>thy</i> (deo), <i>ara</i> (am), <i>lac</i> -125 (am), <i>galU42</i> , <i>galE</i> , <i>trp</i> (am), <i>tsx</i> (am), <i>tyr</i> (<i>supF</i>) (<i>ts</i>)A81), <i>ile</i> , <i>his</i>	(Donachie y col., 1976)
MC1061	F, <i>hsdR2</i> , <i>hsdM</i> ⁺ , <i>araD139</i> , Δ (<i>lac</i> , <i>pro</i>), <i>spoT1</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rspL</i> (StrR)	(Casadaban y Cohen, 1980)
TG1	<i>supE</i> , Δ (<i>lac</i> - <i>proB</i>), <i>thi1</i> , <i>hsdD</i> 5, F'(<i>traD36</i> , <i>lacIq</i> , <i>lacZM15</i> , <i>proAB</i> +))	(Sambrook y col., 1989)
MLM373	CSH16, F ⁻ , Δ (<i>lac</i> , <i>pro</i>), <i>supE</i> , <i>thi</i>	(Santos-Sierra y col., 2003)
LK211	Δ oriC::pKN1562(dirección de las agujas del reloj), <i>asnA</i> ⁺ , <i>km</i> ^r	(Koppes y Nordstrom, 1986)
MC1565	<i>Ilv</i> -192, <i>asnB32</i> , <i>thi</i> -1, <i>relA1</i> , <i>spoT1</i> , <i>fuc</i> , <i>lysA</i> , λ -, F ⁻	(von Meyenburg y col., 1979)
MG1655	F ⁻ , λ -, <i>rph</i> -1	(Blattner y col., 1997)
MG1655 Δ lon- <i>clpP</i>	F ⁻ , λ -, <i>rph</i> -1, <i>lon</i> ⁻ , <i>clpP</i> ⁻	(Dra. Laurence Van Melderen)

M.1.7.- Isótopos radiactivos.

Para marcar las moléculas ADN en su extremo 5', se utilizó el isótopo ³²P en forma de [γ -³²P]- ATP con una actividad específica de 3000 Ci/mmol. Los isótopos fueron suministrados por Amersham Biosciences y por Hartmann Analytic GMBH.

M.1.8.- Material autorradiográfico.

Las películas autorradiográficas del tipo X-Omat fueron suministradas por las casas comerciales de Kodak y AGFA. Las pantallas amplificadoras son de las casas comerciales Amersham Biosciences y Dufowt Cronex. Las placas fotoestimulables para la captación de imágenes con el Phosphorimager son de Amersham Biosciences y de Fujifilm.

M.1.9.- Marcadores de masa molecular.

Los marcadores de masa molecular para ADN fueron suministrados por la casa comercial New England Biolabs.

Como marcadores radiactivos de tamaño molecular se utilizaron las mismas moléculas de ARN marcadas en su extremo 5' utilizadas en cada ensayo y digeridas por MAXAM. También se utilizó la hidrólisis alcalina de las mismas moléculas de ADN marcadas en 5' tal y como se describe en métodos. (M.2.16).

M.1.10.- Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar mediante PCR regiones de ADN cromosómicos y para obtener ADN bicatenario se muestran en la tabla 3. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del plásmido pKN1562, se muestran en la tabla 4. Estos oligonucleótidos han sido sintetizados en el Servicio de Química de Proteínas del CIB mediante química de fosforamidas.

Tabla 3.- Oligonucleótidos empleados para el estudio de la región promotora-operadora del sistema *parD*. En negrita se muestran los cambios de bases introducidos con respecto a la secuencia de ADN silvestre.

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Utilización
XC	TATGGAAGCAACCACGCT	Amplificar y secuenciar la región promotora <i>PparD</i>
XD	TGGGATTAAGTGC GCGTCGCCGCTTT C	Amplificar la región promotora <i>PparD</i>
ID3-R	TGGGATTAAGTGC GCGTCGCCGCTTT C	Amplificar la región promotora (<i>PparD</i>) del plásmido pMLM132
II-I-F	GTTTGGTTGAATTCCCTATTTTATTA AACATTGTGCGTT	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-I-R	AACGCACAATGTTTAATAAAAATAG GGAATTCAACCAAAC	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-D-F	GTTTTTGAAAGTTATATTTTATTGGG AGTTGTGCGTT	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-D-R	AACGCACAAGTCCCAATAAAAATAT AACTTTCAAAAAC	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-ID-F	GTTTGGTTGAATTCCCTATTTTATTG GGAGTTGTGCGTT	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132

II-ID-R	AACGCACA ACTCCCA ATAAAAATAG GGAATTCAACCAAAC	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-DC-F	GTTTGGTTGAAT TCCCTATTTGCGCG GGGAGTTGTGCGTT	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-DC-R	AACGCACA ACTCCCCGCGC AAATAG GGAATTCAACCAAAC	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-C6-F	GTTTGGTTGAAT TCCCTCGCTTCGCT GGGAGTTGTGCGTT	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-C6-R	AACGCACA ACTCCCAGCGAAGCGA GGGAATTCAACCAAAC	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-IC-F	GTTTGGTTGAAT TCCCGCGCGTTATT GGGAGTTGTGCGTT	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-IC-R	AACGCACA ACTCCCAATAACGCGCG GGAATTCAACCAAAC	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-DN-F	GTTTGGTTGAAAGTTATATTTT TATTT TCTCTTGTGCGTT	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-DN-R	AACGCACA AGAGAAA ATAAAAATAT AACTTTCAACCAAAC	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-IDN-F	GTTTGGTTGAAT TCCCTATTTT TATTT TCTCTTGTGCGTT	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-IDN-R	AACGCACA AGAGAAA ATAAAAATAG GGAATTCAACCAAAC	Mutar región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-IDC-F	GTTTGGTTGAAAGTTAG CGCGGGCGC GAAACAATTGTGCGTT	Mutar la región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
II-IDC-R	AACGCACAATGTT TCGCGCCGCGCT AACTTTCAACCAAAC	Mutar región II del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
I-I-F	AGTGGATGTTATATTCTTT GCGCGTA ACTTTTATGGAGG	Mutar la región I del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132
I-I-R	CCTCCATAAAAGTTAC GCGC AAATA ATATAACATCCACT	Mutar la región I del promotor <i>PparD</i> del plásmido pMLM132

Tabla 4.- Oligonucleótidos empleados para la secuenciación del plásmido pKN1562

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Utilización
pKN1562-1	ATATGCCCGGAAAAGTTCAAGAC	Secuenciar la región de <i>repA</i> en pKN1562
pKN1562-2	CACGTAACCGCAATTACAGC	Secuenciar el plásmido pKN1562
pKN1562-3	CGTGGTAATGACAAAAATAGGACA AG	Secuenciar el plásmido pKN1562
pKN1562-4	ATTCAGTGGCTGAGCTACTG	Secuenciar el plásmido pKN1562
pKN1562-5	GATGGAATGCAAAGACTAGAAG	Secuenciar el plásmido pKN1562
pKN1562-6	CATGCAACTTGACGATGAAC	Secuenciar el plásmido pKN1562
pKN1562-7	TGCGCACGTATTCGGTGAAC	Secuenciar el plásmido pKN1562
pKN1562-8	TGACGCGGTAACGCGATCTG	Secuenciar el plásmido pKN1562
pKN1562-9	ATTCTGCTCTGGCCCATTC	Secuenciar el plásmido pKN1562
pKN1562-10	GGAATCGCAGACCGATAC	Secuenciar el plásmido pKN1562
pKN1562-11	CGCAGTCAGTTCGCAGTAG	Secuenciar el plásmido pKN1562
pKN1562-12	GCGCATTCGACAGTACGTTG	Secuenciar el plásmido pKN1562
pKN1562-13	GCGGCGTTCGTTCAAGTATTG	Secuenciar plásmido pKN1562
pKN1562-14	GGATAACACAGGCTCAGTTC	Secuenciar el plásmido pKN1562

Tabla 5.- Otros oligonucleótidos empleados para la realización de este trabajo.

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Utilización
P(D75E) (+) AT	TTGTACGTTGCGAACAACCCCGGACA	Introducir cambio GAT-GAA (Asp75Glu en <i>kid</i>)
P(D75E) (-) AA	ATTGTCCGGGGTTGTTCGCAACGTAC	Introducir cambio GAT-GAA (Asp75Glu en <i>kid</i>)
LppF	AGGTTGCTCCAGCAACGCTAA	Amplificar región en 5' o 3' del gen <i>lpp</i>
LppR	TTAGCACGAGCTGCGTCATCT	Amplificar región del gen - <i>lpp</i> para qPCR
KisF	GCATACCACCCGACTGAAGAGG	Amplificar región del gen <i>kis</i> para qPCR
KisR	GGATCACACTGTGCCAGTAGCT	Amplificar región del gen <i>kis</i> para qPCR

PT7CopA	TAATACGACTCACTATAGGCATAGCT GAATTGTTGG	Amplificación de <i>copA</i>
T151I-F	ATTCCGACCGACATCACGTTCACT GGCTCTGTTTGCTGCCCTTG	Introduce el cambio ACA-ATA (Thr151Ile en <i>repA</i>) en el plásmido pKN1562
T151I-R	CAAGGGCAGCAAACAGAGCCAGTAT GAACGTGATGTCGGTCGGAAT	Introduce el cambio ACA-ATA (Thr151Ile en <i>repA</i>) en el plásmido pKN1562
R55H-F	TGTGGCGCATGCCCCATTCCCGTGGTCT GCGTC	Introduce el cambio CGT-CAT (Arg55His en <i>repA</i>) en el plásmido pKN1562
R55H-R	GACGCAGACCACGGGAATGGGCATG CGCCACA	Introduce el cambio CGT-CAT (Arg55His en <i>repA</i>) en el plásmido pKN1562
RepA1R	GAAGGTGGATGATGAGATTGTT	Secuenciar controladores de replicación del plásmido pKN1562

M.1.11.- Programas y aplicaciones informáticas.

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron los siguientes programas informáticos:

- Microsoft Office: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Outlook, Microsoft Power Point. Microsoft Inc.
- Internet explorer. Microsoft Inc.
- Adobe CS3 Suite: Adobe Photoshop, Adobe Illustrator, Adobe In Design, Adobe®.
- Data Max v2.20.
- Clone Manager Suite 7. Scientific & Educational Software 1992-1994.
- Quantity One. 2006 Bio-Rad Laboratories, Inc
- Nano Drop 2000.
- Bio-Rad IQTM5 v2.1
- Varioskan Flash 2.4.3

M.2.- MÉTODOS.

M.2.1.- Cultivo y conservación de *E. coli*.

Para el crecimiento de las bacterias en medio sólido se utilizó LB-agar suplementado con timina (LBT-agar). Las bacterias se incubaron a 30, 37 o 42 °C (según requerimientos de la estirpe bacteriana), durante un tiempo de entre 12-24 horas.

El crecimiento de los cultivos en medio líquido se realizó en medio LB suplementado con timina (LBT), incubándose con agitación fuerte a 30, 37 o 42 °C, dependiendo de la estirpe utilizada. El seguimiento del crecimiento de los cultivos se realizó por turbidimetría, midiendo su DO_{600nm}, a diferentes tiempos. Las medidas se hicieron utilizando un espectrofotómetro HITACHI U-1100.

Los medios de cultivo fueron suplementados con antibióticos o azúcares según los requerimientos de la estirpe (ver métodos M.1.4).

Para la conservación de las estirpes bacterianas, se crecieron los cultivos en LBT, con el antibiótico adecuado durante, aproximadamente, 12 horas a 30 o 37 °C. Posteriormente, 4 ml del cultivo crecido hasta una DO_{600nm} entre 1.5 y 2, fueron centrifugados a 13000 r.p.m. durante 2 minutos. El sedimento fue resuspendido en 1 ml de glicerol estéril al 10% y, seguidamente, las células fueron congeladas a -70 °C.

M.2.2.- Trasnformación de *E. coli*.

Las células competentes se prepararon siguiendo el método de CaCl₂, descrito por (Hanahan, 1983); (Lederberg y Cohen, 1974). Después de su puesta en competencia, las células, se transformaron empleando el método de choque térmico (Sambrook y Pollack, 1974). Si las células competentes iban a ser almacenadas a -70 °C, se añadió glicerol a una concentración final del 10%.

Para obtener células competentes para electroporación, se utilizó el método descrito por (Miller y Nickoloff, 1995), con ligeras modificaciones. En este caso, las células se lavaron dos veces con agua estéril y el último lavado se realizó con glicerol al 10%. Posteriormente, las células fueron almacenadas en glicerol al 10%. La electroporación se llevó a cabo de manera similar a como se ha descrito en (Dower y col., 1988). Se utilizó el electroporador MicroPulser™ de Bio-Rad.

M.2.3.- Aislamiento de ADN plasmídico.

La extracción del ADN plasmídico de cultivos de *E. coli* se llevó a cabo mediante el “kit” *High Pure Plasmid Isolation* de Roche Molecular Biochemical o mediante el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). La purificación de plásmidos de bajo

número de copias se realizó a gran escala, utilizándose los “kits” de maxi-preparaciones de la casa comercial QIAGEN.

M.2.4.- Aislamiento de ADN genómico.

La extracción de ADN cromosómico se realizó siguiendo el método descrito por (Projan y col., 1983), con ligeras modificaciones. Los cultivos celulares se crecieron durante 12 horas, a 37 °C. Seguidamente, y tras una dilución 1:1000, se permitió su crecimiento hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5. Las células fueron recolectadas a partir de 2 ml de cultivo, y resuspendidas en 300 μ l de tampón (Tris 50mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y sacarosa 20%). Posteriormente, se añadieron 6 μ l de lisozima (10 mg/ml) y tras una incubación de 20 minutos a 4 °C, se adicionaron 12 μ l de Proteinasa K (5 mg/ml) y 3 μ l de RNasa (5 mg/ml) permitiéndose la incubación a 37 °C, durante 90 minutos más. Después, se añadieron 30 μ l de SDS al 10% y las muestras se incubaron 5 minutos a 4 °C. Tras fenolizar y precipitar, el ADN genómico fue resuspendido en H₂O. El ADN obtenido se utilizó como molde en las reacciones de amplificación de ADN (PCRs), y también se usó para la cuantificación del número de copias por equivalente genómico realizado mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

M.2.5.- Extracción de ARN total.

La purificación de ARN total se realizó utilizando el “kit” *Aurum Total RNA* de Bio-Rad, con algunas modificaciones. Los cultivos celulares se crecieron durante 12 horas en medio LBT líquido. Tras diluir los cultivos 1:1000, éstos se crecieron de nuevo hasta alcanzar una DO_{600nm} =0.5. En este punto, las células fueron recolectadas por centrifugación de 6 ml de cultivo (aproximadamente 2.4×10^9 células). Seguidamente en cada muestra añadió 100 μ l de lisozima (500 μ g/ml) y 2.5 unidades de inhibidor de RNasa (*RNasin*[®] *Ribonuclease Inhibitor* de la casa comercial Promega). Posteriormente, se siguió el protocolo descrito por la casa comercial. Para evitar contaminaciones con ADN, tras la elución del ARN, las muestras fueron procesadas de nuevo con RQ DNasa I (2 U) durante 2 horas, a 30 °C (Promega). Seguidamente, se repitió el protocolo de purificación. El ARN se eluyó con tampón de elución (aportado por la casa comercial) y se trató con 2.5 U de inhibidor de RNasa. El ARN total, se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y posterior tinción con BrEt. Posteriormente, se cuantificó mediante espectrofotometría. Todos los ARNs analizados dieron una relación de absorbancia 260/280 de 2, lo que indicaba un alto grado de pureza de las muestras.

M.2.6.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La amplificación de secuencias de ADN genómicas o plasmídicas se realizó en 100 μ l de reacción que contenía: 200 μ M de cada dNTP, 10 μ l de tampón de reacción (10X), 2 μ M de cada oligonucleótido a utilizar, 4 U de Pfu DNA polimerasa y 40 ng de ADN plasmídico. Cuando se utilizó como molde ADN genómico, se utilizaron concentraciones variables de ADN que se obtuvieron mediante diluciones seriadas de

10 veces a partir de la extracción total de ADN cromosómico (ver métodos M.2.4). Se utilizó un termociclador de *Mastercycler gradient* de la casa comercial Eppendorf.

M.2.7.- Obtención de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN (RT-PCR).

La obtención de ADNc se realizó a partir de ARN total (obtenido según se describe en el apartado de métodos M.2.5) y los oligonucleótidos LppR y KisR que hibridan con los transcritos de los genes *lpp* (cromosómico) y *kis* (plasmídico), respectivamente. Se utilizó el “kit” *ThermoScriptTM RNase H-Reverse Transcriptase* de la casa comercial Invitrogen, realizándose ciertas modificaciones sobre el protocolo proporcionado por la casa comercial. Se hizo una mezcla que contenía: 1 μ M de cada oligo (LppR y KisR), 2.5 mM de los dNTPs, 1X de tampón “cDNA Synthesis Buffer”, 5 mM de DTT y 5 U de la enzima transcriptasa reversa. Posteriormente, se adicionaron 300 ng de ARN total, previamente desnaturalizado durante 5 minutos a 65°C, para obtener los 20 μ l finales de reacción. La reacción de retrotranscripción se realizó en un termociclador (IQTM5 *Multicolor Real-Time PCR Delection System* de Bio-Rad) del siguiente modo: Primero, las muestras se pusieron a 56 °C durante 50 minutos y, seguidamente, a 85 °C durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se mantuvieron a 4 °C durante 10 minutos. El ADNc se congeló a -20°C para su posterior utilización en la PCR cuantitativa (qPCR).

M.2.8.- Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).

La amplificación de las secuencias tanto de ADN genómico (para la estimación del número de copias de plásmido por equivalente genómico) como de ADN complementario (ADNc) (para estimar los niveles transcripcionales de *parD*, en tiempo real) se realizó en un volumen final de reacción de 20 μ l. Para cada reacción se utilizó una dilución de 10 veces de una mezcla de iQTM SYBR[®] Green (contienen dNTPs y ADN polimerasa), de la casa Bio-Rad, y 1 μ M de cada oligonucleótido a utilizar. Los oligonucleótidos fueron diseñados y analizados mediante el programa informático Clone Manager Suite 7. Scientific & Educational Software 1992-1994, para obtener dos productos de amplificación de ADN: Uno de 140 pb, en la región cromosómica (gen *lpp*) y otro de 186 pb, en la región amino terminal del gen *kis*. Se utilizó un termociclador IQTM5 *Multicolor Real-Time PCR Delection System* de Bio-Rad. Las reacciones de amplificación se realizaron durante 40 ciclos. Cada ciclo consta de: desnaturalización (95°C, 10 segundos), anillamiento (58°C, 30 segundos) y extensión (72°C, 30 segundos). Las amplificaciones fueron realizadas por el Servicio de Proteómica y Genómica del CIB. Posteriormente, los datos fueron analizados mediante el programa informático Bio-Rad IQTM5 v2.1.

M.2.9.- Marcaje radiactivo del ADN.

El marcaje del extremo 5' de los oligonucleótidos empleados en este trabajo se realizó siguiendo el procedimiento descrito en (Sambrook y col., 1989). Para ello, se utilizó como isótopo radiactivo [γ -³²P]-ATP, con una actividad específica de 3000Ci/mmol, y el enzima T4 polinucleótido quinasa (T₄PKN), de New England Biolabs. La reacción de

marcaje se llevó a cabo según las recomendaciones indicadas por la casa comercial que suministró la T4PKN. Los oligos marcados radiactivamente se separaron del [γ - ^{32}P]-ATP no usado en la fosforilación mediante cromatografía de filtración, empleando las columnas “Micro-Spin TM-G25 o G50” (Amersham), según se pretendiera purificar, respectivamente, oligonucleótidos menores de 20 pb o de mayor tamaño. Se siguió el protocolo recomendado por la casa suministradora.

M.2.10.- Electroforesis del ADN.

Se utilizaron geles horizontales de agarosa al 0.8 y al 2% según el tamaño del ADN a analizar. La electroforesis se realizó en tampón TAE (1X), a voltaje constante (100V). Los geles se tiñeron con BrEt (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y el ADN se visualizó mediante la emisión de fluorescencia del bromuro de etidio irradiado con luz UV.

Para los ensayos de retardo en gel se utilizaron geles verticales de poliacrilamida al 5 y al 8%, según el tamaño del ADN a analizar, en tampón TBE (1X). La electroforesis fue realizada a voltaje constante (100V).

M.2.11.- Purificación de fragmentos de ADN.

La purificación de fragmentos de ADN de tamaño superior a 300 pb, se realizó a partir de geles de agarosa. Para su extracción se utilizó el sistema de QIAquick de Qiagen, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En otras ocasiones, el ADN fue extraído mediante fenolización y precipitación con etanol absoluto.

Los fragmentos de ADN de pequeño tamaño (menores de 300 pb) se purificaron a partir de geles de poliacrilamida (PAA). Tras ser visualizado mediante tinción con BrEt o mediante marcaje radiactivo en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]-ATP, las bandas de ADN fueron cortadas y, el ADN, fue extraído del gel mediante incubación a 42°C, durante 16 horas, en el tampón de elución de fragmentos de gel. El ADN se recuperó mediante extracción fenólica y precipitación con etanol absoluto.

M.2.12.- Cuantificación de ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos fueron cuantificados por espectrofotometría. Para ello, se tuvieron en cuenta los coeficientes de extinción de: 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) cm^{-1} para ADN de cadena doble, 33 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) cm^{-1} para ADN de cadena sencilla y 40 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) cm^{-1} para ARN. Las medidas de absorbancia se hicieron a longitud de onda de 260 nm.

Tanto el ADN total como el ARN total utilizados para la realización de las qPCRs, fueron cuantificados en el espectrofotómetro NanoDrop 200/2000c de Thermo Scientific. Para su cuantificación se utilizó el programa informático (NanoDrop 200/2000c) aportado por la casa comercial.

La cuantificación de fragmentos de ADN marcados radiactivamente con [^{32}P] se realizó directamente mediante la utilización de placas fotoestimulables y el programa de ordenador “Quantity One” de Bio-Rad. Para la cuantificación de ADN a partir de imágenes tomadas se usaron dos programas: Image del phosphorimager de Futji (para las bandas radiactivas almacenadas en las placas fotoestimulables) y Quantity One (para la cuantificación rutinaria del ADN marcado o no radiactivamente, directamente a partir de los geles teñidos con BrEt).

M.2.13.- Secuenciación.

Todos los ADNs fueron secuenciados en el servicio de secuenciación del CIB (SECUGEN) mediante el método de terminadores de cadena de Sanger, (Sanger y col., 1977).

Los ADNs marcados radiactivamente fueron secuenciados mediante el método de secuenciación química descrito por Maxam y Gilbert (Maxam y Gilbert, 1980).

M.2.14.- Mutagénesis del ADN.

M.2.14.1.- Mutagénesis con hidroxilamina.

La mutagénesis al azar del plásmido pKN1562 y sus derivados isogénicos pJLV01 y pAB174, se realizó mediante tratamiento con hidroxilamina. Se procedió según el protocolo descrito por (Hashimoto y Sekiguchi, 1976). Para ello, se utilizaron: 20 μl de ADN plasmídico (4 μg de ADN); 100 μl de tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 6.0 conteniendo EDTA 1 mM; 80 μl de hidroxilamina 1M (Sigma), pH6.0 y EDTA 1mM. La mezcla se incubó a 65°C durante 45 minutos. A continuación, las muestras se dializaron a 4°C frente a 500 ml de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA) durante 2 horas, y frente a otros 500 ml de este tampón durante 12 horas.

M.2.14.2.- Mutagénesis dirigida.

Para introducir cambios en un determinado codón en la proteína Kid, en la proteína iniciadora de replicación RepA, así como también, para introducir mutaciones en la región promotora-operadora de *parD*, se utilizó el “Kit” *QuikChange® XL II Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Para aumentar la frecuencia de mutantes termosensibles en replicación y en la resistencia a kanamicina de pKN1562, se utilizó un tratamiento con hidroxilamina de pKN1562 *in vitro* según se describe en el apartado M.2.14.1. El ADN de pKN1562 así tratado, se utilizó para transformar la estirpe *E. coli* OV2 y los mutantes se identificaron por secuenciación según se indica en el apartado M.2.13.

M.2.15.- Rotura enzimática del ADN.

Las digestiones de ADN por enzimas de restricción se llevaron a cabo según las condiciones de reacción especificadas por el fabricante (tampón de reacción, tiempo y temperatura). Las reacciones dobles de digestión se realizaron simultáneamente cuando las condiciones de reacción de ambas enzimas lo permitían, y de forma secuencial cuando éstas eran incompatibles. El resultado de las digestiones con enzimas de restricción fue visualizado por UV tras la electroforesis de una alícuota de la reacción en gel de agarosa al 0.8% teñido con BrEt.

M.2.16.- Purificación de Kis y Kid.

La purificación de las proteínas Kis, con cola de 6 histidinas, y de la proteína Kid, se llevó a cabo siguiendo el protocolo de purificación por cromatografías de afinidad y de intercambio iónico (Hargreaves y col., 2002a), con ligeras modificaciones. Tras la inducción y procesamiento de los cultivos, los extractos celulares se cargaron en una columna de cromatografía de afinidad por níquel (Ni-IMAC). Los complejos his-Kis-Kid retenidos en la columna fueron disociados en varios pasos. En primer lugar, se eluyó Kid mediante tratamiento con un agente desnaturizante (hidrocloruro de guanidinio 5 M e imidazol-HCl 20 mM, pH 8.0). Seguidamente, se eluyó his-Kis mediante la adición de 50 mM de EDTA (secuestra el Ni^{2+} de la columna y deshace la unión de his-Kis a la misma) a un tampón que contenía hidrocloruro de guanidinio 5 M y 20 mM de Tris-HCl, pH 8.0. Las proteínas Kid e his-Kis se replegaron mediante diálisis en tampón de replegado (0.5 M sulfato amónico, 50 mM acetato amónico, 20 mM b-mercaptoetanol, 0.1 mM EDTA y 5% glicerol); se realizó un segundo paso de diálisis en tampones para cromatografía en SP-sefarosa y Q-sefarosa en ausencia de glicerol (20 mM HEPES, 50-25 mM KCl, 5 mM β -mercaptoetanol y 0,1 mM EDTA), según se estuvieran purificando Kid o his-Kis. Seguidamente, las proteínas se sometieron a un segundo paso de purificación que consistió en una cromatografía de intercambio iónico (SP-y Q-sefarosa). La elución de his-Kis o Kid se realizó mediante un gradiente salino de KCl, 25-50 mM, para his-Kis, o 50-500 mM, para Kid.

M.2.17.- Cuantificación de proteínas.

Las proteínas fueron cuantificadas mediante espectrofotometría usando su coeficiente de extinción molar a 280 nm, ϵ^{280} , calculado a partir de su composición de aminoácidos, siendo para Kid 5560 y para his-Kis 7930 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

M.2.18.- Ensayos de retardo en gel.

Los ensayos de retardo en gel (EMSA) se realizaron según se describe en (Garner y Revzin, 1981), (Monti y col., 2007) Se utilizaron los siguientes ADNs: i) un fragmento

de ADN de 174 pb, que contenía las regiones I y II del promotor-operador del sistema *parD*, ii) un fragmento de 81 pb que contenía la región II, y iii) un fragmento de 115 pb que incluía la región I. Todos los fragmentos habían sido marcados, previamente, en su extremo 5' con [γ - 32 P]-ATP (1.4x10⁶ CPM/mol). El ADN a 2 nM se incubó con una mezcla de Kid y/o Kis, empleándose diferentes relaciones molares entre ambas. Los ensayos de unión proteína-ADN, se realizaron durante 1 hora a 4 °C, en tampón de unión (ver apartado M.1.3). Estos ensayos de retardo en gel también fueron realizados a altas concentraciones de ADN frío (350 nM) utilizando distintas relaciones molares entre Kis y/o Kid. Cuando se requirió, poli [d(I-C)] a 70 μ M fue utilizado como un ADN competidor, no específico, que se añadió a las reacciones de incubación durante 5 minutos más, una vez permitida la unión de las proteínas al DNA. Posteriormente, las muestras se sometieron a electroforesis a 4 °C, en geles nativos de poliacrilamida al 8 % (para los fragmentos de ADN de 81 pb y 115 pb) o al 5% (para el fragmento de 174pb). El ADN se visualizó mediante exposición autorradiográfica.

M.2.19.- Ensayos de protección frente a rotura por radical hidroxilo (OH \cdot).

Los ensayos de protección frente a radical hidroxilo se realizaron tal y como se describe en (Monti y col., 2007). Para ello, se utilizaron dos fragmentos de ADN marcados en el extremo 5' con [γ - 32 P]-ATP: i) un fragmento de 175 pb que contenía las regiones I y II de *PparD* y ii) otro fragmento de 115 pb que contenía la región I. Ambos fragmentos fueron incubados con Kid y/o Kis por separado. Los complejos proteína-ADN, se formaron utilizando las mismas condiciones que han sido descritas en los ensayos de retardo en gel (ver métodos M.2.18). Tras la incubación, los complejos proteína-ADN fueron tratados con una solución que contenía: sulfato de hierro 100 μ M, EDTA 200 μ M, ascorbato sódico 1 mM y peróxido de hidrógeno al 0.3%. Seguidamente, las muestras fueron incubadas a 4 °C durante 5 minutos. Las reacciones de corte del ADN fueron paradas por la adición de una mezcla que contiene: tiourea 8 mM y EDTA 1.7 mM. Los complejos proteína-ADN, fueron separados del ADN libre mediante electroforesis en geles de poliacrilamida nativos al 5% y visualizados mediante exposición autorradiográfica. Posteriormente, estos complejos fueron cortados del gel y eluidos a 42 °C, durante 12 horas, en tampón de elución. Los ADNs fueron precipitados, disueltos en solución desnaturalizante con formamida y analizados en geles de poliacrilamida al 8 %, en presencia de urea 8 M. Los productos de corte fueron visualizados por exposición autorradiográfica.

M.2.20.- Ensayos de actividad β -galactosidasa.

Para realizar estos ensayos se utilizó la estirpe MLM373, que contiene el plásmido indicador pMLM132 (*PparD::lacZ*) o sus derivados mutantes en la región promotora-operadora, así como el plásmido pBR322 o su derivado pAB24, que aporta el sistema *parD* en *trans*. Los cultivos se crecieron a 37°C en LB durante 16 horas. Posteriormente, se diluyeron 1000 veces en medio LB y se crecieron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica DO_{600nm} =0.4-0.5. Seguidamente, 200 μ l de cada cultivo fue procesado según se describe en (Miller, 1972). La actividad β -galactosidasa se determinó en unidades de Miller. Se obtuvieron tres valores independientes para cada cultivo ensayado y con ellos se calculó el valor medio y la desviación estándar. Las mediciones de la actividad β -galactosidasa se realizaron en el espectrofluorímetro

Varioskan Flash de la casa *Thermo Scientific*, usando el programa informático Varioskan Flash 2.4.3.

M.2.21.- Aislamiento de mutantes termosensibles de kanamicina y replicación.

Los plásmidos pKN1562 (*parD*-wt) y sus derivados pAB174 (Δ *parD*) y pJLV01 (*parD*-*kidD75E*) fueron mutagenizados con hidroxilamina, y transformados en células de *E. coli* OV2 (*supFts*) en medio selectivo (Km), a 30°C. La estirpe OV2 se caracteriza por la presencia del supresor termosensible *supFts*, que es capaz de suprimir mutaciones ambar a 30°C pero no a 42°C. Las células con plásmido se rescataron estriándolas en medio selectivo, a 30°C. Seguidamente, fueron propagadas durante dos pases (aproximadamente 60 generaciones) a 42°C, en medio no selectivo. Posteriormente, fueron de nuevo estriadas en medios selectivos tanto a 30°C como a 42°C. Los mutantes termosensibles de replicación no crecen en medios selectivos ni a 30°C ni a 42°C, mientras que los mutantes de kanamicina termosensibles crecen a 30°C pero no a 42°C. Los mutantes aislados termosensibles de replicación fueron rescatados de la placa maestra y tras posterior extracción del ADN fueron identificadas las mutaciones por secuenciación.

M.2.22.- Determinación del número de copias de plásmido por equivalente genómico (PCN).

La determinación del número de copias por equivalente genómico fue realizada según el trabajo descrito por (Lee y col., 2006), con modificaciones. *E. coli* OV2 fue usada como bacteria huésped. El ADN total fue extraído de los cultivos a D.O.₆₀₀=0.5 en medio selectivo (kanamicina) y digerido durante 2 horas a 37 °C con *EcoR*I, que produce un único corte en los plásmidos utilizados. La relación de absorbancia a 260/280 fue entre 1.8 y 2, indicando una mínima contaminación de proteínas. En primer lugar se realizaron dos curvas patrón a partir de 800 ng de ADN genómico con diluciones seriadas, de 5-10 veces, por triplicado: i) una curva patrón para la amplificación de una región del plásmido pKN1562 o sus derivados, que contiene la región amino terminal del gen *kis* y ii) una curva patrón para la amplificación de una región cromosómica incluida dentro del gen *lpp*.

La curva estándar es un gráfico del ciclo umbral (Ct) frente al logaritmo de la concentración del ADN (Co). La cantidad absoluta del ADN plasmídico y genómico para una muestra problema se puede estimar mediante la interpolación de su valor Ct en las curvas estándar.

La relación obtenida entre el valor de concentración, dado por las curvas patrón, entre *lpp/kis* para pKN1562 silvestre fue dada el valor de 1 (según la fórmula que se describe al final de este apartado) y la relación obtenida del mismo modo entre las diferentes muestras se relativizó con respecto a este valor estándar. Obteniéndose valores relativos de número de copias de plásmido con respecto a la muestra silvestre (Figura 7).

Todos los datos del número de copias fueron corregidos para el porcentaje de células con plásmido habidas en el cultivo.

PCN = Tamaño del ADN cromosómico (pb) x cantidad de ADN plasmídico (ng) /
Tamaño del ADN plasmídico (pb) x cantidad de ADN cromosómico (ng)

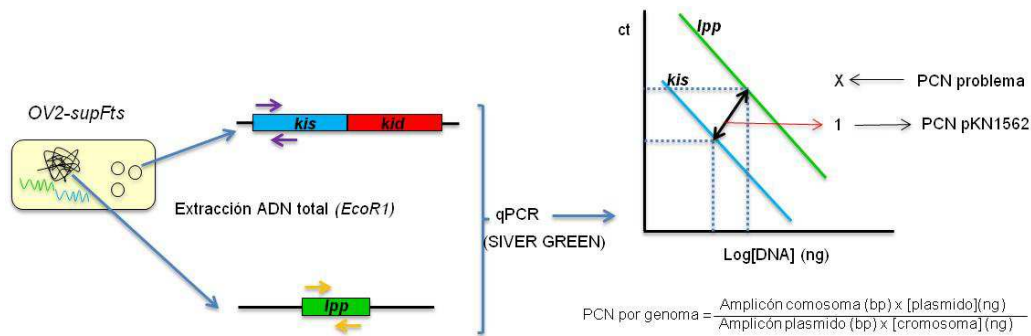


Fig.7.- Esquema de la cuantificación de número de copias de plásmido por genoma equivalente. Se muestra en azul la antitoxina (*kis*) y en verde el gen de la lipoproteína, usado como referente cromosómico. Las flechas indican los productos de amplificación en azul oscuro para la amplificación de la antitoxina (azul oscuro) y para la amplificación del gen de la lipoproteína (*lpp* en amarillo). También se muestra una representación de la curva patrón para el plásmido (amplificación de *kis* en azul) y en verde para la curva patrón cromosómica (amplificación del gen de la lipoproteína en verde).

M.2.23.- Análisis transcripcional del sistema *parD* mediante RT-qPCR.

Se analizaron los niveles transcripcionales del sistema *parD* en diferentes mutantes termosensibles de replicación aislados en pKN1562 (*parDwt*) y pJLV01 (*parD-kidD75E*), tomando como referencia cromosómica el gen de la lipoproteína (*lpp*). Para ello se extrajo el ARN total de tres cultivos independientes crecidos a una DO = 0.5 tal y como se describe anteriormente (ver métodos M.2.5). El ARN fue cuantificado mediante espectrofotometría. Para cada reacción de retrotranscripción se usó una cantidad de 300 ng de ARN total, obteniéndose así el ADN complementario (ver métodos M.2.7). Se hizo una curva patrón, usando ADN complementario obtenido anteriormente, tanto para el producto de amplificación del gen *lpp* como para el del gen *kis*, realizando diluciones seriadas de 10 veces y usando los mismos oligonucleótidos que se han descrito en el apartado anterior. De todas las muestras se hicieron controles negativos, para descartar posibles contaminaciones de ADN. Para ello, se utilizó la misma cantidad de ARN sin retrotranscribir. La qPCR se hizo utilizando una dilución de 100 veces de los productos obtenidos en la reacción de RT-PCR y comprobando que están dentro de la linealidad de la curva patrón. Posteriormente, se calcularon los niveles de transcripción mediante la siguiente fórmula; $2^{(Ct_{lpp} - Ct_{kis})}$. Dado que estamos analizando los niveles transcripcionales de *parD* en mutantes termosensibles de replicación, los valores de transcripción que se obtuvieron se corrigieron para el número de copias de plásmido por equivalente genómico.

R.- RESULTADOS.

R.- RESULTADOS.

R.1.- Secuenciación del plásmido pKN1562 del factor de resistencia a antibióticos R1.

R. 1.1.- Resultados de la secuenciación y mapa genético del plásmido.

pKN1562 es un miniplásmido del factor de resistencia a antibióticos R1 en el que se definió el replicón mínimo del plásmido R1 (Nordstrom y Nordstrom, 1985) y donde se aisló el primer mutante que permitió la identificación del sistema toxina-antitoxina *parD* (Bravo y col., 1987). El replicón básico incluye los genes específicamente implicados en inicio de replicación *repA*, *tap* y el origen de replicación *oriR1* así como los genes *copA* y *copB* que controlan los niveles de replicación y mantienen un número de copias bajo. El sistema auxiliar de estabilidad *parD* es un operon bicistrónico que codifica dos proteínas de pequeño tamaño, una antitoxina, Kis (*Killing supressor*) y una toxina, Kid (*Killing determinant*). Durante esta tesis doctoral se ha secuenciado el plásmido pKN1562. Aunque existía información de secuencia de estas dos regiones y se disponía de la secuencia del replicón, no se conocía la secuencia completa de este plásmido de referencia. Esta secuencia se ha obtenido como parte del trabajo de Tesis. La secuenciación se realizó en el servicio de secuenciación del CIB (SECUGEN) mediante el método de terminadores de cadena de Sanger (Sanger y col., 1977) y se ha validado determinando la secuencia de la cadena complementaria. La secuenciación se llevó a cabo sobre dos tipos de muestras: ADN plasmídico purificado a partir de cultivos líquidos con el “kit” de maxipreparaciones de Qiagen o a partir de colonia usando amplificaciones por PCR del ADN plasmídico mediante el “Kit” ManiPhiTM de la casa comercial de Xpolbiotech. Los resultados de ambas secuenciaciones mostraron que tanto la longitud del producto de secuenciación como la calidad de los resultados mejoraron, en las regiones más alejadas, cuando se usó ADN plasmídico purificado como molde. Debido a que pKN1562 es un plásmido de bajo número de copias, la secuenciación a partir de colonia realizada en este proyecto ha puesto a punto este método para su posible aplicación en otros plásmidos de bajo número de copias, donde la extracción de ADN plasmídico es más laboriosa. En la figura 8 se muestra el mapa del plásmido pKN1562 con indicación de los marcos de lectura abiertos (ORF) identificados.

Se han identificado los genes correspondientes a los controladores CopB y CopA, a la proteína acopladora Tap y a la proteína iniciadora de replicación RepA a la que sigue la región del origen de replicación *oriR1*. Inmediatamente después del origen de replicación se encuentra el ORF de RepA4 que está conservado en los plásmidos de la familia IncFII (Ryder y col., 1982). También se encuentra un gen de una proteína de membrana, *tir*, un activador del transporte del fosfoglicerato (*pgtA*) y genes implicados en transposición (*insA* e *insB*); sin embargo, *insA* es una versión trunca y no funcional de la que se encuentra en R100. Las diferencias de esta región pueden reflejar la construcción del miniderivado.

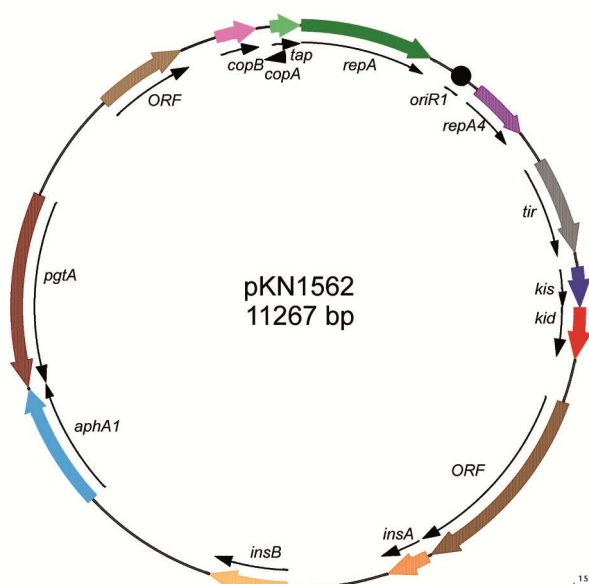


Fig. 8.- Mapa de pKN1562. En él se localizan: el gen de resistencia a kanamicina, *aphA1* que se ha utilizado como marcador de selección; el origen de replicación *oriR1*; el gen *repA* de la proteína iniciadora de la replicación; los genes *copB* y *copA* que controlan el número de copias del plásmido; el gen *tap* (*translation adaptation protein*) cuya traducción se requiere para la síntesis eficiente de la proteína RepA y los genes *kis* y *kid* del locus toxina-antitoxina *parD*.

La secuencia inicial obtenida sobre una de las dos cadenas y verificada según se indica más arriba se recoge en el anexo 1. Se ha hecho un alineamiento entre regiones de las secuencias de pKN1562 y R100 que indica que hay variaciones puntuales que parecen restringidas a una zona amplia que incluye el replicón básico de estos plásmidos (anexo 1; 22pb-1628pb: *repA*, *Ori*, *repA4*). En el caso del controlador CopB y de su diana, el promotor del gen *repA*, estas variaciones puntuales han dado lugar a diferencias funcionales: CopB no es intercambiable entre los dos replicones. Sin embargo si lo es el controlador principal de la replicación y determinante de incompatibilidad, el RNA antisentido CopA, ya que ambos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad. También es interesante resaltar que las secuencias de los genes y regiones reguladoras de los sistemas toxina-antitoxina de tipo II de ambos plásmidos, denominados *parD* y *pem* respectivamente en R1 y R100, son perfectamente idénticas.

R.1.2.- Resumen.

1.- Se ha completado la secuencia del miniplásmid de R1 pKN1562 obtenido de cultivo o de colonia que extiende la información de secuencia de las regiones de replicación y toxina-antitoxina que se estudian en este trabajo.

2.- El análisis comparativo de las secuencias y el orden de los genes en R1 y R100 es consistente con el origen común de los dos factores de resistencia a antibióticos y confirma y extiende las diferencias puntuales entre los dos replicones previamente detectada.

3.- Las secuencias correspondientes a las proteínas de los sistemas auxiliares de estabilidad *parD* y *pem* y a sus regiones reguladoras son idénticas y también su localización relativa. Ello es consistente con la propuesta hecha por otros autores (Gerdes y col., 2005) que este sistema ha sido adquirido recientemente por los dos plásmidos y que existe una región preferente para su integración que es común en los dos plásmidos.

R.2.- Acoplamiento entre módulos de replicación y sistema *parD*.

R.2.1.- Análisis del “fenotipo de interferencia” observado en el plásmido pKN1562: obtención de mutantes termosensibles en la resistencia a kanamicina y de replicación por mutagénesis *in vitro* con hidroxilamina.

En esta tesis se presenta un análisis del acoplamiento entre los módulos de replicación y del sistema toxina-antitoxina Kis-Kid mediante el estudio de la actividad este sistema TA cuando la replicación del plásmido está afectada por mutantes condicionales de replicación y abrir una vía hacia la identificación del interruptor molecular que acopla los dos módulos. Los mutantes termosensibles en replicación se indujeron en el mini plasmido pKN1562 (*parD*⁺) y en variantes de este plasmido con un sistema *parD* inactivo mediante tratamiento *in vitro* con hidroxilamina y se rescataron junto con variantes no mutadas (la mayoría) mediante transformación en la estirpe OV2. Se utilizaron como temperatura permisiva y no permisiva 30°C y 42°C, respectivamente. Los mutantes termosensibles en la resistencia kanamicina aparecieron con una frecuencia próxima a 1/500. Mutantes termosensibles de replicación aparecieron con frecuencias relativas que dependen de la presencia en *cis* de un sistema *parDwt* o mutado (ver más abajo) y se pierden después de sucesivos pases a la temperatura no permisiva; estos mutantes se rescatan de una primera placa maestra (Figura 9). Los efectos de la mutación fueron extremos a 42 °C pero también fueron claros a 30 °C y fue a esta temperatura que mimetiza una replicación ineficiente, a la que se hizo el análisis del efecto en replicación y del acoplamiento entre módulos

Una de de las consecuencias del acoplamiento es la interferencia de *parD* con el aislamiento de mutantes termosensibles de replicación, fenotipo que denominamos “de interferencia”. Esta interferencia puede medirse como una disminución en la frecuencia de aislamiento de mutantes termosensibles en replicación con respecto a la frecuencia de aislamiento de los los mutantes termosensibles en la resistencia a kanamicina que es independiente de *parD*. Dos consecuencias adicionales del acoplamiento son la desregulación del sistema *parD* en respuesta a una replicación ineficiente y la contribución del sistema a la recuperación de la replicación plasmídica (número de copias), que tal como se explicó en la introducción, dependen de la actividad de la toxina Kid.

En el experimento se determinaron las frecuencias de aislamiento de mutantes termosensibles en replicación y de mutantes resistentes a kanamicina en tres miniplásmidos R1: pKN1562 (*parD*-wt), pJLV01 (*parD-kidD75E*) y pAB174 (Δ *parD*). pKN1562 tiene el sistema *parD* silvestre y codifica una toxina con actividad RNasa y con capacidad co-reguladora. pJLV01 es un derivado de pKN1562 que lleva una

mutación puntual en *kid*, *kidD75E* introducida por mutagénesis dirigida que neutraliza la actividad RNasa de la toxina Kid pero mantiene su carácter regulador (Diago-Navarro y col., 2009). Esta mutación permite correlacionar los efectos de la toxina Kid con su actividad RNasa y evaluar el efecto de las mutaciones *repts* sobre la actividad transcripcional del sistema.

La interferencia debería de reproducirse claramente en pKN1562 que lleva un locus *parD-wt* y se manifestaría como una caída drástica en la frecuencia de aislamiento de mutantes *repts* con respecto a los mutantes termosensibles en la resistencia a kanamicina (*aphAIts*). pAB174 es también un derivado de pKN1562 que tiene delecionado el gen *kid* y la region 3' terminal del gen *kis* (Bravo y col., 1987). Debido a la delección en pAB174 el sistema está desactivado y desregulado.

Experimentos previos habían indicado que el fenotipo de interferencia se perdía en pAB174, esto es, era posible aislar con similar frecuencia mutantes termosensibles en replicación y en la resistencia a kanamicina (Bravo y col., 1987). Es previsible que esta interferencia se pierda también en pJLV01, si el acoplamiento es dependiente de la actividad RNasa de la toxina.

Como se ha indicado y se esquematiza en la figura 9, despues del tratamiento *in vitro* con hidroxilamina, los plásmidos se introdujeron en *E. coli* OV2 (*supFts*) mediante transformación, y los transformantes se seleccionaron a 30 °C en placas de Luria-Agar conteniendo kanamicina a 50 µg/ml (LA-Km). Las colonias transformantes se estriaron en el mismo medio y las estrías se crecieron a 30°C (placa maestra). Seguidamente, se propagaron durante dos pases (aproximadamente 60 generaciones) a 42°C, en placas de LA sin kanamicina y, finalmente, fueron de nuevo estriadas y propagadas en medio selectivo (LA-Km) tanto a 30°C como a 42°C. Los mutantes termosensibles de replicación no crecen en medio selectivo ni a 30°C ni a 42°C, debido a que han perdido el plásmido a la temperatura no permisiva, mientras que los mutantes termosensibles en la resistencia a kanamicina crecen a 30°C pero no a 42°C, tal y como se muestra en la figura 9.

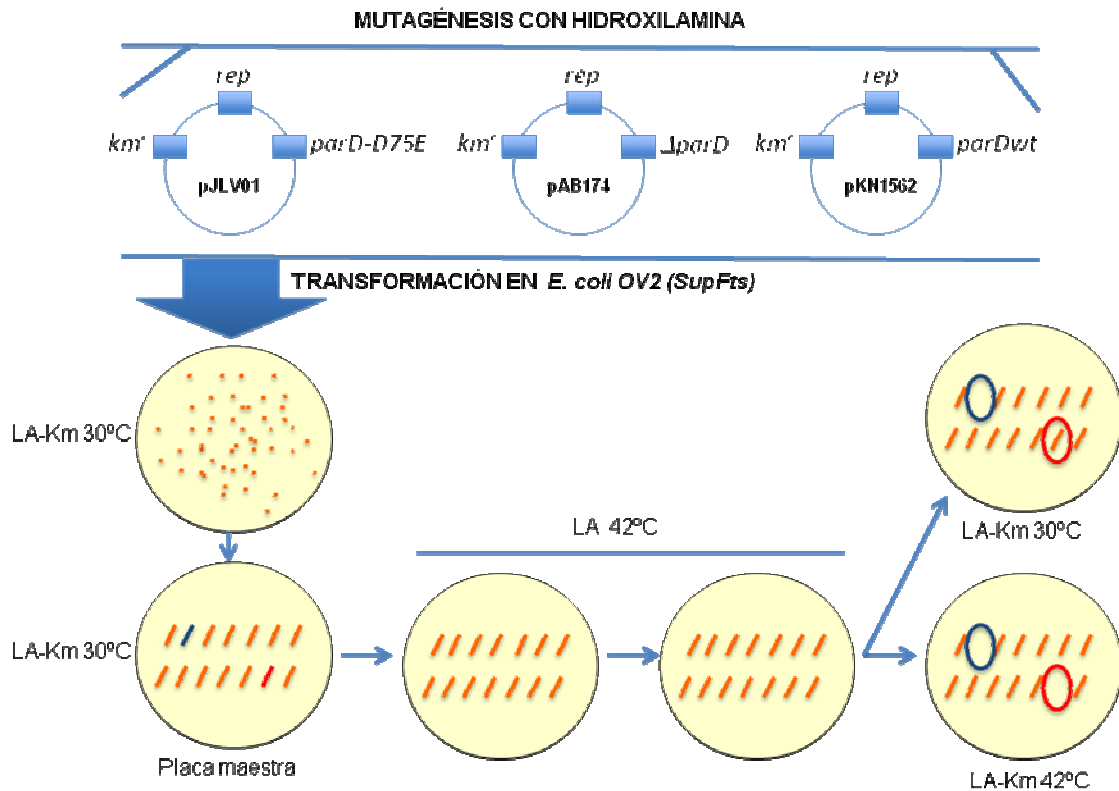


Fig. 9.- Esquema del aislamiento de mutantes termosensibles de replicación y kanamicina. pKN1562 (*parDwt*) y sus derivados pAB174 (Δ *parD*) y pJLV01 (*parD-kidD75E*) fueron mutagenizados con hidroxilamina y transformados en *E. coli* OV-2 (*supFts*) en medio selectivo (LA-Km), a 30°C. Las células con plásmido se rescataron estriándolas en medio selectivo, a 30°C. Seguidamente, fueron propagadas durante dos pases (aproximadamente 60 generaciones) a 42°C en medio no selectivo (LA). Posteriormente, fueron de nuevo estriadas en medio selectivos tanto a 30°C como a 42°C. Los mutantes termosensibles de replicación no crecen en medio selectivos ni a 30°C ni a 42°C (azul), mientras que los mutantes termosensibles en la resistencia a kanamicina crecen a 30°C pero no a 42°C (rojo).

Posteriormente, los mutantes termosensibles de replicación fueron aislados de la placa original y se comprobó su termosensibilidad propagando una mezcla de 20 colonias (para cada mutante) a 42 °C durante dos pases, de 16 h cada uno, en placas de LA sin kanamicina. 100 colonias fueron estriadas y crecidas a 30 °C en placas de LA con kanamicina. Los mutantes termosensibles de replicación pierden el plásmido que le confiere la resistencia a kanamicina tras dos pases a 42°C en medio no selectivo y por ello no crecen al estriar en presencia del antibiótico.

En presencia de un sistema funcional *parD*, pero no en su ausencia, el fenotipo de interferencia debería causar una reducción clara de la proporción Repts/AphA1ts. Este fue el caso: la proporción Repts/AphA1ts encontrada con pAB174 o pJLV01 era igual a 1 pero este valor se redujo a 0.3 en células transformadas con el plásmido pKN1562 mutagenizado (ver Tabla 6). Los valores similares obtenidos de Repts/AphA1ts en los plásmidos pAB174 y pJLV01, indican que el acoplamiento modular analizado requiere la actividad RNasa de la toxina Kid, y se observa en presencia del potencial co-regulador de la toxina. Se confirma que la delección del sistema también anula el fenotipo de interferencia.

Tabla 6.- Número de mutantes termosensibles de kanamicina (*AphA1ts*) y de replicación (*repts*) en *E. coli* OV2 (*supF*)

Plásmidos	Número de mutantes Km termosensibles	Número de mutantes de replicación	Relación entre mutantes termosensibles aislados de replicación y de kanamicina
pKN1562	19	6	0.3
pJLV01	11	11	1
pAB174	19	19	1

Tabla 7.- Mutantes obtenidos en la proteína RepA por mutagénesis con hidroxilamina

Tipo de plásmido	Número de mutantes	Tipo de mutación	Cambio de aminoácido introducido
pKN1562	1	CAG-UAG	Gln 209 Ambar
pKN1562	1	CGC-AGC	Ala 52 a Ser
pKN1562	1	GCC-ACC	Ala 54 a Thr
pKN1562	1	CGG-UGG	Arg 70 a Thr
pKN1562	1	UGG-UAG	W 175 Ambar
pKN1562	1	CAG-UAG	Q 183 Ambar
pAB174	3	CCA-TCA	Pro 64 a Ser
pAB174	1	CGC-UGC	Arg 268 a Cys
pAB174	1	CAG-UAG	Gln 133 Ambar
pAB174	1	TGG-TAG	Trp 175 Ambar
		AGC-AAC	Ser 278 a Asn
pAB174	3	GCG-GTG	Ala 52 a Val
pAB174	1	GGA-GAA	Gly 248 a Glu
pAB174	3	CGU-CAU	Arg 55 a His
pAB174	2	CUU-UUU	Leu 212 a Phe
pAB174	2	CAA-CCA	Gln 6 a Pro
pAB174	2	CAC-CCC	His 5 a Pro
pJLV01	1	CGU-CAU	Arg 55 a His
pJLV01	1	GAC-AAC	Asp 84 a Asn
		CGU-GUG	Arg 221 a His
pJLV01	1	GCG-GUG	Ala 52 a Val
pJLV01	1	GAA-AAA	Glu 260 a Lys
pJLV01	1	GCU-GUU	Ala 71 a Val
pJLV01	1	GCC-GUC	Ala 120 a Val
pJLV01	1	CCG-TCG	Pro 17 a Ser
pJLV01	1	GCC-ACC	Ala 87 a Thr
pJLV01	1	ACA-AUA	Thr 151 a Ile
pJLV01	1	UGG-UAG	Trp 175 a Ambar
pJLV01	1	CGC-TGC	Arg 249 a Cys
		CGT-CAT	Arg 264 a His

R.2.2.- Caracterización de mutantes condicionales de replicación: localización de las mutaciones aisladas.

La región de replicación de los plásmidos mutantes se secuenció para localizar las mutaciones y para identificar los cambios introducidos (ver métodos M.2.13). Las

mutaciones *repts* se localizaron en el replicón básico de los mini derivados de R1 (pKN1562, pAB174 y pJLV01) y se determinó el efecto en la replicación evaluando el su efecto en el número de copias del plásmido a temperatura permisiva. Las mutaciones estaban localizadas fundamentalmente en *repA*, el gen de la proteína iniciadora RepA en los tres plásmidos estudiados. También se obtuvieron mutaciones que afectaban a replicación y que se localizaban en el gen *tap* de la proteína acopladora Tap (dos mutaciones idénticas aisladas en pJLV01 y en pKN1562 que no resulta en cambio de aminoácido) y en el origen de replicación *oriR1* (dos mutaciones idénticas que se aislaron en pJLV01 y pAB174, ver figura 10). Este cambio se localizaba en uno de los palíndromes con los que interacciona preferentemente la proteína iniciadora de replicación.



Fig. 10.- Palíndromes de interacción de la proteína iniciadora de replicación RepA. En rojo se muestra la base afectada en el mutante aislado de replicación en los plásmidos pAB174 y pJLV01.

Una representación lineal de los mutantes aislados en *repA* indica que en los plásmidos carentes de actividad tóxica de Kid (pAB17 y pJLV01) estas mutaciones se localizan a lo largo de toda la proteína RepA, y que en el plásmido parental pKN1562, que tiene un sistema *parD* silvestre, la localización parece restringida a dos regiones particulares que corresponden a los aminoácidos 52-70 y del 175-209 (figura 11).

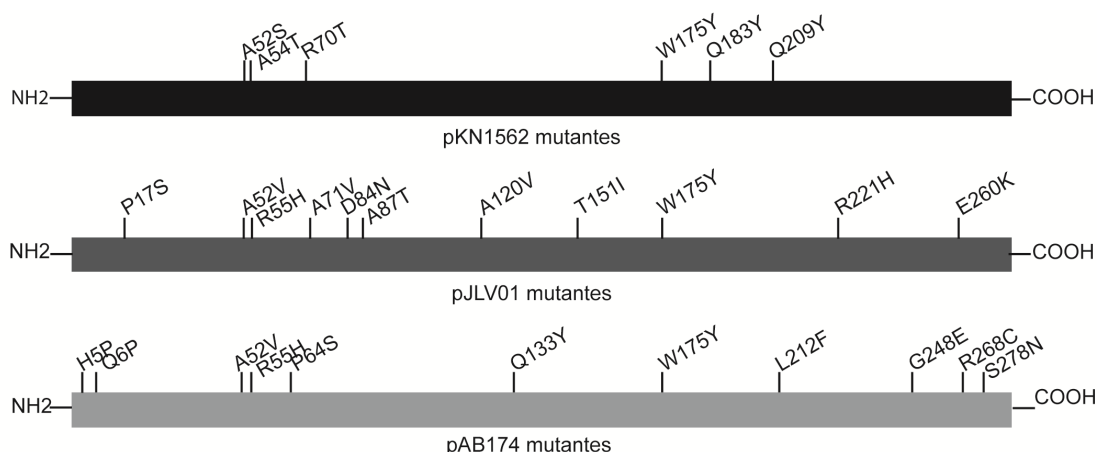


Fig. 11.- Cambios en la secuencia de aminoácidos de RepA introducidos por las mutaciones *repA*ts. Se indican los cambios introducidos por la mutaciones en los plásmidos: pKN1562 (*parD*-wt, en negro), pJLV01 (*parD*-kidD75E, en gris oscuro) y pAB174 (*parD*- Δ kid, en gris claro).

R.2.3.- las mutaciones *repA*ts disminuyen el número de copias del plásmido y activan transcripcionalmente el sistema *parD*.

Es previsible que los mutantes termosensibles en replicación tengan a la temperatura permisiva un número de copias del plásmido reducido. La determinación de este valor (PCN por equivalente genómico) se realizó mediante PCR cuantitativa según se indica en M.2.22 y se esquematiza en la figura 12 A y C. Los valores se extrapolaron al obtenido para el plásmido silvestre pKN1562. Todos los mutantes de replicación analizados tienen reducido su número de copias a la temperatura permisiva (PCN, por *Plasmid Copy Number* por genoma equivalente), en pJLV01 (Figura 12 paneles A y C).

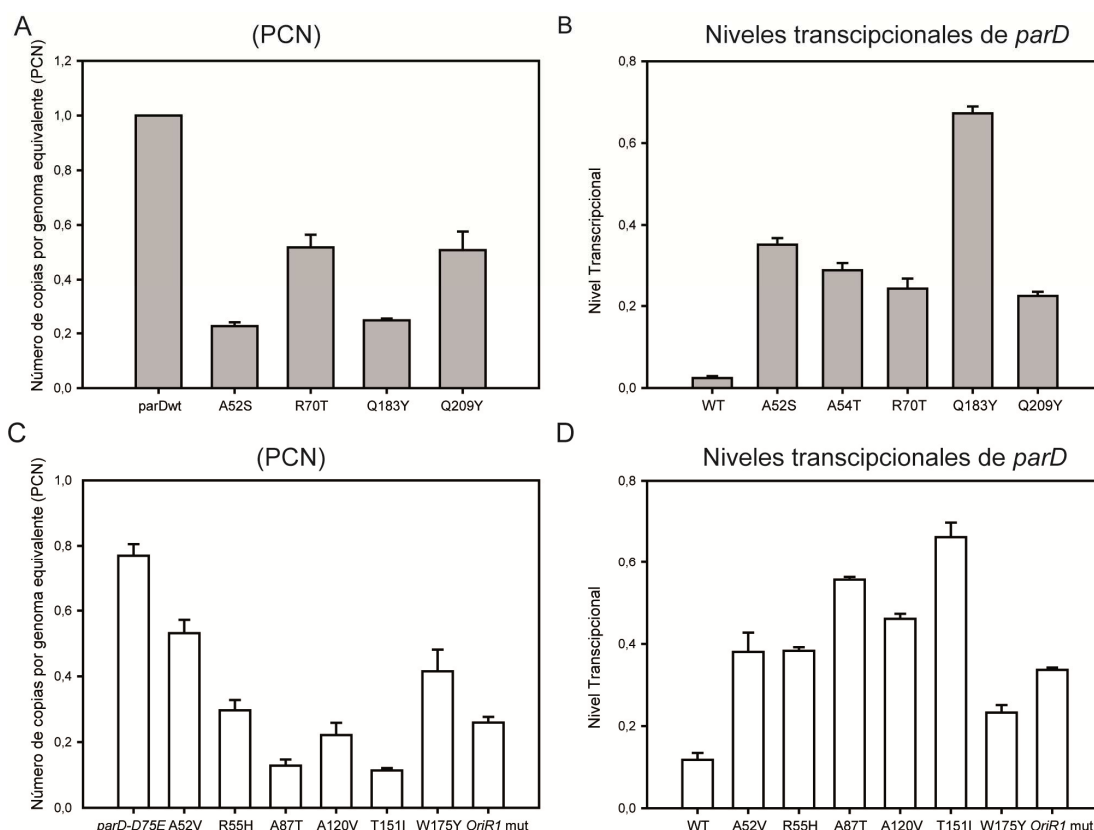


Fig. 12.- Número relativo de copias de plásmido por genoma equivalente (PCN) y análisis transcripcional del sistema *parD* de los plásmidos analizados. Los valores obtenidos para el plásmido pKN1562 y sus derivados se muestran en barras grises, mientras que los obtenidos para pJLV01 y sus derivados se muestran en blanco. Paneles (A) y (C) muestran, respectivamente, el número relativo de copias de plásmido por genoma equivalente de mutantes obtenidos en pKN1562 y en pJLV01; el valor de PCN del pKN1562 silvestre fue usado como referente. Paneles (B) y (D) muestran, respectivamente, los valores de niveles transcripcionales de *parD* obtenidos para pKN1562 en pJLV01 y sus mutantes *Repts*.

El fenotipo de interferencia confirmado y cuantificado durante el aislamiento de los mutantes sugiere que la deficiencia en replicación de los mutantes cuantificada como un descenso en el número de copias, activa el acoplamiento entre los módulos de replicación y toxina-antitoxina. Este acoplamiento se ha evaluado directamente analizando los niveles transcripcionales del sistema *kis-kid* en los mutantes *repts* y comparándolos con los niveles observados en el plásmido parental.

Los niveles transcripcionales de *parD* por número de copias, en diferentes mutantes *repts* aislados en pKN1562 y en pJLV01, fueron determinados por análisis RT-qPCR según se indica en Materiales y Métodos (M.2.23) y los valores se representa en la figura 12 paneles B y D. Se refirió en todos los casos al valor obtenido para el gen cromosómico de la lipoproteína. Notar que este análisis transcripcional fue también posible en pJLV01 debido a que la mutación KidD75E afecta específicamente a la actividad RNasa de la toxina Kid pero no a su actividad co-reguladora. Los resultados indican que el sistema *kis-kid* esta desregulado en todos los mutantes *repts* y que esta desregulación tiene una relación inversa con el número de copias del plásmido. Estos resultados indican que el sistema *kis-kid* se activa transcripcionalmente en respuesta a una replicación ineficiente y que es la bajada en el número de copias la determinante del grado de activación observado.

R.2.4.- La activación del sistema *parD* contribuye a rescatar la eficiencia de replicación en los mutantes *repA*s.

Otra de las consecuencias aparentemente paradójica del acoplamiento entre módulos es la contribución del sistema *parD* a una recuperación de la eficiencia de replicación. Como se ha mencionado esta recuperación es debida a una activación parcial de la toxina Kid asociada a la desregulación del sistema en condiciones de replicación ineficiente y al procesamiento del el mensajero policistrónico *copB-repA* por la actividad RNasa de la toxina. Como también se ha indicado en la introducción, este procesamiento disminuye lo niveles de CopB que es un represor del promotor de *repA* y por lo tanto, aumenta los niveles de la proteína iniciadora y la eficiencia de replicación.

El análisis de este fenotipo se evaluó comparando el número de copias de los mismos mutantes *repts* en pKN1562 que tiene un sistema *parD*-wt o en pJLV01 que lleva la mutación *parD-kidD75E*. Como se ha indicado, la utilización de este mutante permite analizar el efecto de las mutaciones *repts* en los niveles de transcripción del sistema. Con este fin se seleccionaron las mutaciones *repA55* y *repA151* que cambian, respectivamente, R55 por Histidina y T151 por Isoleucina en la proteína RepA. Estas mutaciones fueron aisladas en pJLV01 (*parD-kidD75E*) y se introdujeron por mutagénesis dirigida en el plásmido pKN1562.

Los resultados indican que en pJLV01 el número de copias relativo correspondiente a las mutaciones *repA55* o *repA151* es de 0.3 y <0.2, respectivamente. Estos valores aumentaron en el fondo *parD* silvestre (pKN1562) a valores 0.8-1 y 0.2, respectivamente (figura 13 panel A), indicando que este sistema *parD* silvestre se activa y es capaz de recuperar parcialmente la eficiencia de replicación. La neutralización del rescate por la mutación *kid-D75E* indica una correlación directa del rescate con la actividad RNasa de Kid. Los resultados añaden que el rescate es ineficaz en mutantes *repts* que en pJLV01 tienen un número de copias relativo inferior a 0.2 pero que es claramente significativo cuando este valor es al menos 0.3.

Se determinaron también los efectos de estas dos mutaciones sobre los niveles transcripcionales de *parD* tanto en presencia de un sistema funcional *parD*⁺ (pKN1562) como en el sistema inactivado por la mutación *kid-D75E* (pJLV01). Los resultados

obtenidos indican que ambas mutaciones desregularon claramente el sistema *parD* y lo hacen en una relación inversa al número de copias (figura 13 panel B).

Un resultado interesante, encontrado en este análisis, fue que los niveles transcripcionales relativos del sistema *parD* asociado a las mutaciones fueron más altos en ausencia de un sistema funcional *parD* (pJLV01) que en su presencia (pKN1562). Esto sugiere un efecto directo de la actividad RNasa de Kid sobre los niveles transcripcionales de *parD*. De hecho existe un sitio preferente de corte por Kid, 5'-U-UAC-U-3', en el ARN mensajero policistrónico de la antitoxina de *parD*.

Finalmente se determinó el efecto de las mutaciones sobre la estabilidad de los plásmidos pKN1562 y pJLV01. Es previsible que exista una correlación directa entre el número de copias del plásmido y su estabilidad, y que un rescate en la eficiencia de replicación fuese acompañado de una mayor estabilidad. Los resultados para los dos mutantes estudiados tanto en un contexto *parD*_{wt} como en un contexto *parD*-*kid75* se muestran en el panel C de la figura 13. Estos resultados indican la baja estabilidad del mutante *T151*, que en pJLV01 tiene asociado un número de copias bajo y que no es rescatado eficientemente por el sistema *parD*-*wt*, y una estabilidad mayor del mutante *R55H*, que tiene un número de copias mayor en pJLV01 y que es rescatado eficientemente por el sistema *parD*-*wt*. Los datos indican que el rescate sólo es eficiente a partir de un valor umbral en el número de copias.

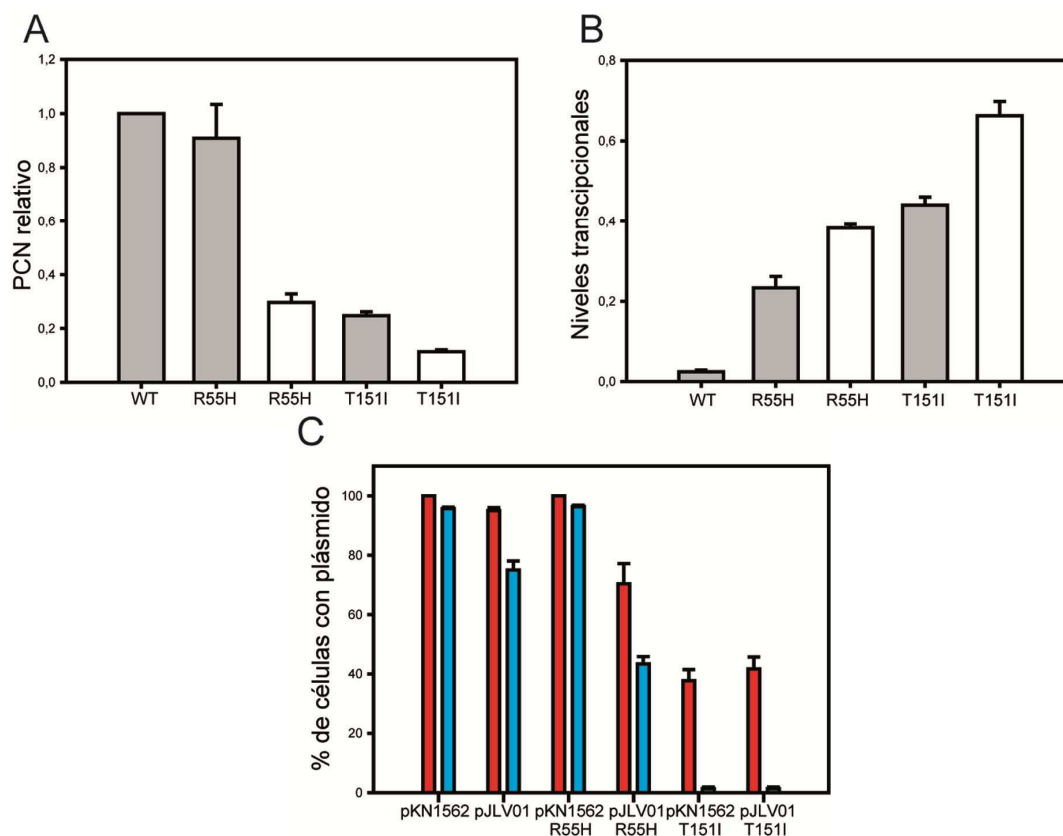


Fig. 13.- El análisis comparativo de los efectos de mutaciones *repA*ts en los plásmidos pKN1562 y pJLV01. (A) Se muestra el PCN y (B) los niveles transcripcionales de *parD*. Se muestra el efecto de las mutaciones en el PCN y en niveles transcripcionales de *parD* con barras grises en pKN1562 y blancas sus isogénicos en pJLV01 (tanto en A como en B). (C) Se muestra la estabilidad plasmídica de pKN1562, pJLV01 y sus derivados mutantes en *repA*ts. Barras rojas muestran la estabilidad en 30 generaciones, aproximadamente, y barras azules estabilidad en 60 generaciones, aproximadamente.

R.2.5.- El nivel de la antitoxina Kis es el factor clave que acopla los módulos de replicación y sistema *parD* del plásmido R1.

Como la antitoxina Kis es el elemento que confiere especificidad a las interacciones que regulan la expresión de *parD* y además es el componente más inestable del sistema, quisimos estudiar si estaba implicada en el acoplamiento entre replicación y el sistema *parD*. La desregulación del sistema en los mutantes *repts* y la activación de la toxina Kid detectable en el rescate replicativo sugerían como posible causa una reducción de los niveles de la antitoxina Kis. La señal inicial podría ser la disminución de la dosis génica de *kis-kid* asociada a la caída en el número de copias del plásmido en mutantes condicionales de replicación. Como el fenotipo de interferencia es una señal del acoplamiento entre módulos de replicación y *parD* del plásmido R1, se utilizó este fenotipo de interferencia para testar esta hipótesis. En el experimento se evaluó si un aumento de los niveles de la antitoxina podría neutralizar la interferencia. Por esta razón, se transformó el plásmido pKN1562, previamente mutagenizado con hidroxilamina, en una estirpe bacteriana que sobre-produce la antitoxina Kis (MG1655 llevando el plásmido sobre-productor pMLM126) y en la estirpe paternal (MG1655) y determinamos en cada caso la proporción *Repts/AphA1ts*. El fenotipo de interferencia fue claro en la estirpe paternal (*Repts/AphA1ts* = 7/27 = 0.26) pero esta proporción aumentó drásticamente en la presencia del sobre productor de Kis (*Repts/AphA1ts* = 10/8 = 1.2). En experimentos independientes se repitió el mismo análisis pero usando como receptora del ADN mutagenizado pKN1562, una estirpe delecionada de *lon* y *clpP*, los genes de las principales proteasas que actúan degradando la antitoxina Kis. La estabilidad de la toxina está modulada por ClpP y se incrementa en ausencia de esta proteasa (Dra. Elizabeth Diago Navarro, datos no publicados). El análisis indicó que la estabilización de la antitoxina Kis en ausencia de ClpP suprimió también el fenotipo de interferencia (*Repts/AphA1ts* = 7/6 = 1.1).

El resultado del análisis es consistente con la hipótesis de que los niveles de la antitoxina Kis disminuyen en los mutantes *repts* y que esta disminución desregula el sistema *parD* y activa al menos parcialmente la toxina Kid que a su vez puede rescatar parcialmente la replicación del plásmido. Los niveles de la antitoxina Kis en los mutantes no pudo evaluarse directamente debido a la falta de sensibilidad de los anticuerpos anti-Kis disponibles.

R.2.6.- Resumen.

- 1.- Utilizando distintos mutantes de replicación del plásmido R1 se ha explorado la existencia de un acoplamiento funcional entre el replicón básico del plásmido y el sistema toxina-antitoxina *parD* del mismo.
- 2.- El análisis establece, claramente, una correlación inversa entre la eficiencia de replicación plasmídica y la activación del sistema *parD*, que se manifiesta como una desregulación del sistema y una activación parcial de la toxina del sistema.
- 3.- El acoplamiento entre sistemas permite una recuperación de la eficiencia de replicación y estabilidad del plásmido en los mutantes condicionales de replicación.

Esta recuperación es estrictamente dependiente de la actividad RNasa de la toxina Kid y ocurre más eficientemente por encima de un umbral de replicación.

4.- El análisis realizado cuantifica el fenotipo que se ha denominado “de interferencia” que es una huella del acoplamiento entre módulos.: la frecuencia relativa de aislamiento de mutantes condicionales de replicación disminuye aproximadamente un 70% en presencia de un sistema *parD*-wt.,

5.- La anulación del fenotipo de de interferencia por un aumento artificial de los niveles de la antitoxina o de su estabilidad implica que los niveles de la antitoxina disminuyen en los mutantes de replicación debido a la bajada en la dosis génica y que esta disminución es el sensor del acoplamiento entre módulos. La hipótesis puede valorarse más directamente determinando, con anticuerpos anti-Kis, la correlación entre eficiencia de replicación y niveles de la antitoxina. Sin embargo, la falta de sensibilidad adecuada de los anticuerpos anti-Kis disponibles no ha permitido este análisis.

6.- El estudio ha permitido obtener una extensa colección de mutantes condicionales de replicación de R1. La localización de las mutaciones en RepA, así como el efecto que éstas puedan tener sobre la replicación de R1 se comentarán en la discusión sobre la base de un modelo de la estructura de la proteína RepA realizado por el Dr. Rafael Giraldo en colaboración con este proyecto.

R.3.- Interacciones modulares del sistema *parD* en la región promotora-operadora (PO).

Una parte importante de esta tesis es el estudio de las interacciones de la antitoxina y de la toxina con la región promotora-operadora del sistema *parD*. Esta región contiene dos secuencias palindrómicas, denominadas I y II, que podrían ser sitios específicos de interacción del represor con esta región del promotor. Para caracterizar y analizar la participación de estos sitios en la regulación del sistema, se han utilizado distintas técnicas tales como: i) ensayos de retraso en gel (EMSA) para ver las interacciones de las proteínas con la región promotora-operadora, ii) ensayos de protección frente a radical hidroxilo (*footprinting*) para identificar sobre el ADN las secuencias contactadas por el represor, iii) ensayos de espectrometría de masas nativa que permiten determinar la estequiometría y el tipo de los complejos formados por Kis y Kid con la región promotora-operadora tanto wt como con mutaciones en las regiones I y/o 2 y iv) ensayos in vivo (β -galactosidasa) de la actividad del promotor *parD* tanto wt como con mutaciones en las regiones I y II que permiten determinar el papel de estas regiones en la regulación del sistema. .

R.3.1.- La antitoxina Kis, pero no la toxina Kid, interacciona con la región promotora de *parD*.

Datos previos a este trabajo indicaban que la antitoxina Kis es un represor transcripcional débil del operón *parD* y que el operón estaba regulado eficientemente por la toxina y la antitoxina (Santos-Sierra y col., 2002). Sin embargo, la caracterización

detallada de la interacción de la antitoxina o de un complejo toxina-antitoxina con la región reguladora, de este operón, no habían sido analizadas. El análisis que se presenta en esta tesis define estas interacciones y añade información adicional importante sobre el papel de la relación entre los niveles relativos de la toxina y de la antitoxina del sistema.

En primer lugar, se procedió a analizar la interacción de las proteínas del sistema con un fragmento de ADN de 174 pb, que contiene la región promotora-operadora de *parD*, mediante ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) (figura 14, paneles A y B). El fragmento de 174 pb, contiene la secuencia promotora-operadora del sistema *parD*, que incluye dos secuencias palindrómicas I y II, que podrían ser sitios de interacción del represor. Las regiones I y II (23 pb cada una) contienen una repetición interna de 18 pb que es perfecta en la región I, e imperfecta en la región II. Ambas regiones I y II están separadas por 33 pb y están situadas entre las posiciones -73 y +5 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Ruiz-Echevarria y col., 1995c). Entre las regiones I y II se encuentra el elemento -35 del promotor; mientras que la región I solapa con la caja -10 extendida del promotor y con el sitio +1 de inicio de transcripción (figura 14, panel C).

Para los ensayos de retraso en gel, se utilizó el fragmento de ADN marcado en su extremo 5' con ^{32}P , y concentraciones crecientes de la antitoxina Kis, en presencia o ausencia de la toxina Kid. Tras realizar la unión de las proteínas al ADN (ver M.2.18), las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Los cambios de movilidad electroforética del ADN, que son consecuencia de la interacción específica de las proteínas, se identificaron mediante la autorradiografía del ADN marcado radiactivamente. El análisis indicaba que a una relación molar de 1200:1 de Kis con respecto al fragmento de ADN de 174 pb no se observan retardo de este fragmento (figura 14, panel A). A una relación molar de 1200:1 y 2400:1 (figura 14 panel A, calles 7 y 8) podemos ver ADN libre (f DNA) y un complejo de movilidad electroforética reducida (c0), mientras que a una relación molar de 4800:1 (figura 14 panel A, calle 9) apenas queda ADN libre y se observa el complejo de retardo que denominamos c0. Estos datos muestran que la antitoxina Kis interacciona con baja afinidad con la región promotora-operadora de *parD* observándose una transición desde no interacción con el ADN hasta la formación de complejo c0.

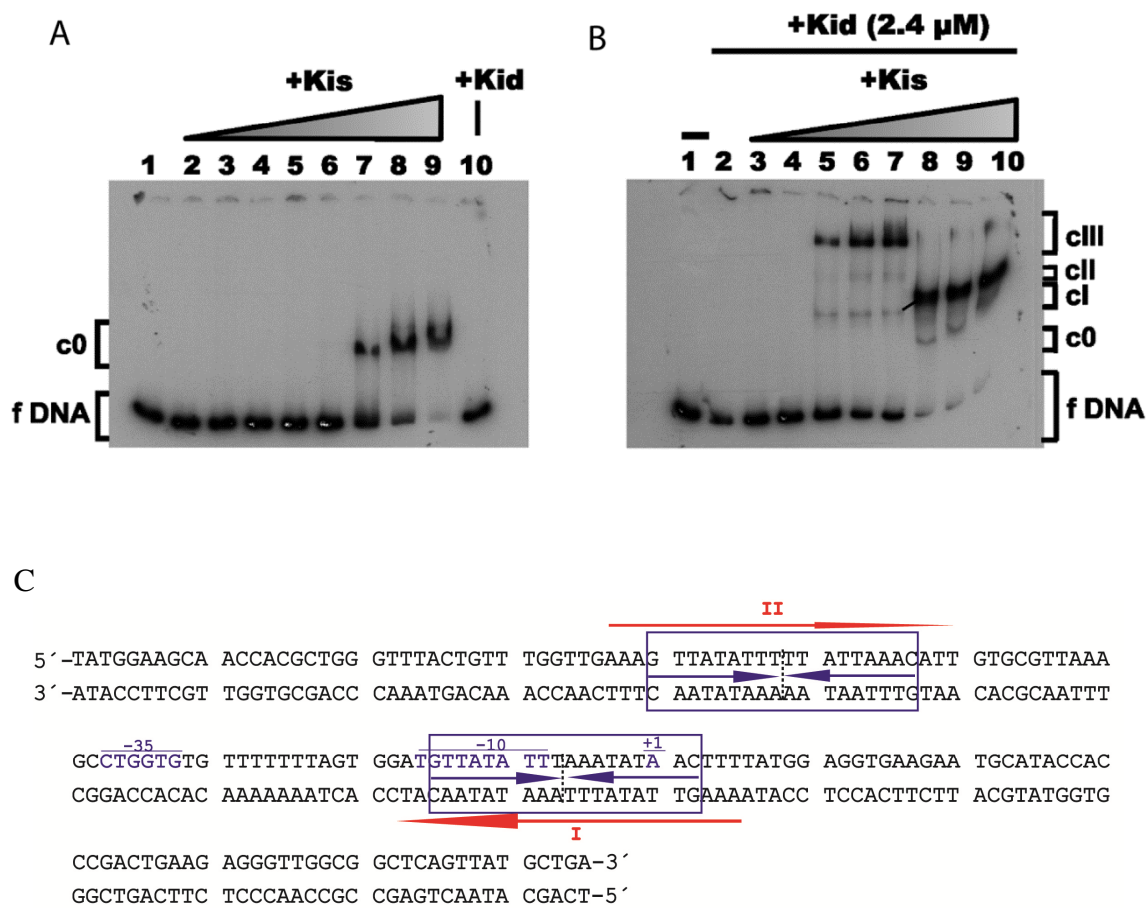


Fig. 14.- Efecto de Kid en la unión de con la región promotora de *parD*. Los ensayos de retraso en gel fueron realizados con un fragmento de ADN (174 pb) marcado en su extremo 5' con ^{32}P , conteniendo la región promotora-operadora de *parD* (regiones I y II) y Kis y/o Kid. (A) Cambio de movilidad electroforética del ADN (2nM) en presencia de un rango de concentraciones de Kis (0.075, 0.150, 0.300, 0.600, 1.2, 2.4, 4.8 y 9.6 μM) (calles de 2-9). Control, Kid (2.4 μM ; calle 10). (B) Cambio de movilidad electroforética del ADN producido por la interacción con el complejo Kis-Kid. Se utilizó un rango de concentraciones de Kis idénticas a las utilizadas en el panel (A) (calles 3-10), y en presencia de una concentración fija de Kid (2.4 μM). La calle 1 es un control sin proteínas y la calle 2 es un control sin Kid. Los complejos específicos formados por la unión de Kis y Kid al ADN son indicados como c0, cI, cII y cIII.

Los contactos específicos que Kis establece con la región promotora-operadora de *parD* fueron analizados por ensayos de protección frente a radical hidroxilo (ver métodos M.2.19). Estos ensayos mostraron que Kis contacta con la región promotora-operadora de *parD* en las dos repeticiones invertidas (regiones I y II de 23 pb) (figura 14, panel C). Se observó una protección que es más prominente en las regiones correspondientes a las dos ramas del palíndromo perfecto que incluye la secuencia. La rama izquierda del palíndromo se superpone con el elemento -10 del promotor y la protección observada sugiere un papel directo de estas interacciones en la regulación del sistema *parD*.

La unión de Kid fue testada bajo las mismas condiciones, sin embargo, no se han podido detectar complejos debidos a la unión de Kid con la región promotora-operadora de *parD*. Estos datos muestran que en las condiciones de ensayo, a diferencia de la

antitoxina Kis, la toxina Kid no interacciona directamente con el operón del sistema *parD* (figura 14 panel A, calle 10).

R.3.2.- La toxina Kid incrementa la afinidad de Kis por el promotor del sistema *parD*.

Para analizar si la toxina Kid influía en la interacción de la antitoxina Kis con la región promotora-operadora, realizamos ensayos de cambio de movilidad electroforética del fragmento promotor-operador en presencia de las dos proteínas. Se usaron concentraciones crecientes de la antitoxina Kis, como en el experimento anterior (figura 14, panel A), pero en presencia de una concentración fija de la toxina Kid (2.4 μ M) (figura 14, panel B). Los resultados muestran que cuando interviene Kid, se forman complejos de interacción que se detectan a una concentración de Kis 10 veces menor que la observada cuando Kid no estaba presente en el ensayo, sugiriendo que la toxina Kid, aunque no se une al ADN, aumenta la eficiencia de interacción de la antitoxina Kis con el fragmento promotor-operador. Los datos también muestran que el patrón y la estabilidad de los complejos de retardo formados en presencia de las dos proteínas depende de sus dosis relativas: en exceso de la toxina, los complejos de retardo tienen una movilidad electroforética menor que los formados en exceso de antitoxina. Se puede observar una transición drástica en el patrón de movilidad electroforética que ocurre cuando la dosis de antitoxina es igual o superior a la de la toxina. En estas condiciones se forma un complejo proteína-ADN principal que tiene una movilidad electroforética mayor y que es estable a competición con heparina. Presumiblemente, este complejo es el que corresponde al represor del sistema. Los resultados sugieren que hay múltiples interacciones entre los complejos Kid-Kis y la región promotora-operadora de *parD* y que la relación entre las dos proteínas juega un papel muy importante en la formación de un complejo represor eficiente.

También fueron analizadas las interacciones entre Kis y Kid-Kis y el fragmento de 174 pb que incluye el promotor de *parD*, mediante ensayos de *footprinting* con radical hidroxilo (figura 15, paneles A y B). El fragmento de ADN utilizado en estos ensayos incluye las repeticiones I y II (figura 15, panel C). Para realizar este experimento, se extrajeron de gel de PAA no desnaturizante las bandas de retardo obtenidas por la unión del ADN con la antitoxina sola (complejo c0, figura 14 A) o con la toxina y la antitoxina en exceso de esta última (complejo cI obtenido a una relación molar Kid:Kis:ADN de 1200:2400:1; figura 14, panel B). Estos complejos proteína-ADN habían sido tratados, previamente, con condiciones en las que se generaron radicales hidroxilo, reactivo que introduce un corte por molécula de ADN. Los distintos fragmentos de rotura se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes. Las regiones de ADN que estaban protegidas por las proteínas se identificaron mediante autorradiografía. Los resultados indican que tanto Kis como el complejo Kid-Kis protegen las dos secuencias repetidas incluidas en las regiones I y II del promotor *parD* (figura 15 panel A y B). Debido a que el patrón de protección obtenido en presencia de Kis solapa con el patrón de protección obtenido en presencia de los complejos Kid-Kis, tanto en la cadena codificante como en la no codificante, y a que Kid no interacciona con el ADN, los resultados sugieren que Kis pilota la interacción específica del complejos Kid-Kis con la región promotora-operadora en las

regiones I y II. Además, los datos muestran que la región espaciadora de 33 bp localizada entre las regiones I y II no está protegida por las proteínas (figura 15).

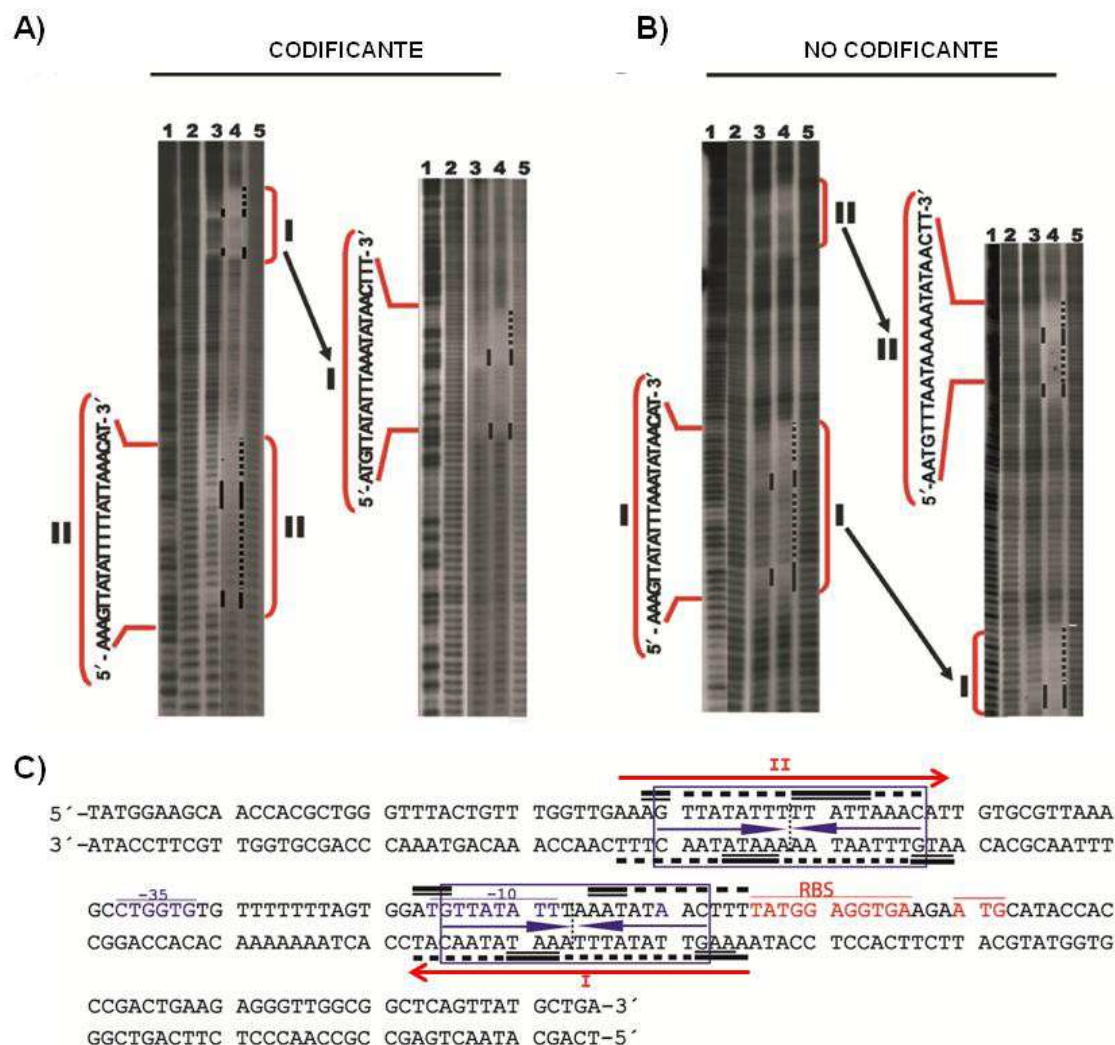


Fig. 15.- Kis y Kid-Kis interaccionan con sitios específicos en el promotor-operador de *parD*. Se realizaron ensayos de protección frente a radical hidroxilo (*footprinting*) utilizando las siguientes concentraciones de Kis, Kid y del fragmento de 174 pb: para la formación del complejo Kid-Kis-ADN (2.4 μ M Kid, 4.8 μ M Kis y 2nM ADN), y para la formación del complejo Kis-ADN (4.8 μ M Kis y 2nM ADN). Las protecciones observadas en la cadena codificante (**A**) y en la no codificante (**B**) se indican con líneas continuas (protecciones fuertes) y discontinuas (protecciones débiles). El carril 3 muestra el patrón de protección por Kis sola, y el carril 4 muestra el patrón de protección obtenido por la unión del complejo Kid-Kis al ADN (paneles A y B). Se muestran las secuencias de las repeticiones invertidas I y II que incluyen las regiones protegidas por las proteínas. Los carriles 2 y 5 muestran el patrón de corte del ADN en ausencia de proteínas. El carril 1 muestra la secuencia de ADN, obtenida mediante Maxam-Gilbert (escalera AG). (**C**) Resumen de las protecciones obtenidas en las regiones I y II, por Kis o por los complejos Kid-Kis. La región I contiene una secuencia de 18 pb (recuadrada) con un elemento de simetría doble perfecta, que incluye el motivo -10 del promotor. El sitio II incluye un elemento pseudo-simétrico de 18 pb que también ha sido recuadrado. El eje de simetría en cada región se indica con una línea discontinua. Las bases cuyas desoxirribosas están protegidas por Kis (barras finas) o Kid-Kis (barras gruesas) de la rotura por radical hidroxilo han sido indicadas. Las secuencias de la caja -35, el elemento -10 extendido y el sitio +1 de inicio de la transcripción, se encuentran marcados en azul. En rojo, el sitio de unión al ribosoma (RBS) y el codón de inicio de la traducción para Kid (metionina). Las repeticiones invertidas I y II están indicadas con flechas rojas. El fragmento de 30 pb de DNA usado para los ensayos de espectrometría de masas nativas contiene la región I y además dos pb a 5' y 5 pb a 3' con respecto al centro de simetría de la secuencia.

R.3.3.- La antitoxina Kis y los complejos Kid-Kis interaccionan en dos regiones separadas, I y II, del promotor-operador y lo hacen más eficientemente con la región I que con la región II.

Los ensayos de protección frente a radical hidroxilo identificaron los sitios I y II como sitios de unión de Kis y de los complejos Kid-Kis en el promotor-operador de *parD*. Para evaluar la importancia de cada una de estas regiones en la interacción con Kis o con el complejo Kid-Kis, las regiones I y II fueron separadas en dos fragmentos de ADN de diferente tamaño: i) un fragmento de 115 pb que contiene la región I y ii) un fragmento de 81 pb que contiene la región II (figura 16, paneles A y B). Estos fragmentos fueron marcados con ^{32}P en su extremo 5', y se realizaron ensayos de retraso en gel tanto con Kis como con Kis y Kid, usando diferentes relaciones molares (figura 16, paneles C y D). Cuando usamos el fragmento con la región I, se forma el complejo cIV a una relación Kis:ADN igual o superior a 2400:1 (figura 16 panel A, calles 9 y 10); en los ensayos realizados con la región II (figura 16, panel B calle 10) se observa el complejo cIV, pero a una relación 4800:1 de Kis:ADN. Estos resultados muestran que la antitoxina Kis interacciona específicamente con ambos fragmentos de la región promotora de *parD*, pero la afinidad de Kis por la región I es mayor que por la región II. Los ensayos de cambio de movilidad electroforética de los fragmentos de 115 pb (región I) y 81 pb (región II) fueron también realizados con mezclas de Kid y Kis (figura 16 panel C y D). Al igual que con el ensayo realizado con el fragmento de 174 pb que contenía las regiones I/II, se usó Kid a una concentración fija y Kis a concentraciones variables. En el fragmento con la región I, el primer complejo de retardo observado se obtuvo a una relación molar Kid:Kis:ADN de 1200:150:1 (figura 16, paneles C y D, calle 2), mientras que para la región II el complejo de retardo se observó a una relación molar de Kid:Kis:ADN de 1200:600:1 (figura 16, paneles C y D, calle 4). Por lo tanto, la afinidad de los complejos Kid-Kis por la región I es mayor que por la región II, lo cual es equivalente a lo que ocurre con Kis sola que tiene mayor afinidad por la región I que por la II.

El tipo de complejos formados entre los fragmentos de *parD*, conteniendo las regiones I o II, y los complejos Kid-Kis fueron dependientes de la relación molar entre ambas proteínas. Cuando la concentración de Kis fue más baja que la concentración de Kid, los complejos definidos como cVI fueron más abundantes, mientras que cuando la concentración de Kis se aproximó a la concentración de Kid, el complejo cV llegó a ser el más abundante. En adición, el complejo cIV observado en exceso de Kis, puede representar la unión de Kis sola, pues aparece a la misma altura que el observado en las incubaciones entre Kis y el mismo fragmento. Un patrón similar fue observado con el fragmento de 174 pb que contiene las dos regiones I y II; sin embargo en los fragmentos con el sistema I o II la abundancia del complejo c0 fue muy bajo. Esas diferencias entre las regiones aisladas I y II y el fragmento que contiene ambas regiones, podría sugerir interacciones cooperativas entre las regiones I y II.

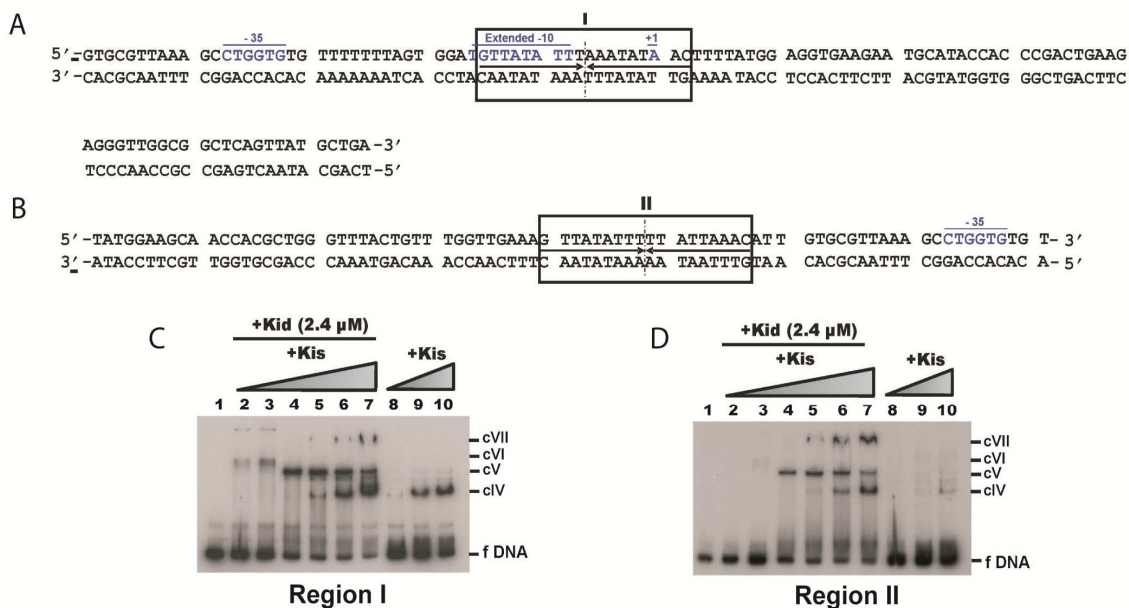


Fig. 16.- Interacción de Kis y del complejo Kis-Kid con las regiones I o II de *parD*. A y B. Se muestra la secuencia de los fragmentos de ADN de 115 pb y 81 pb, que contienen las regiones I y II, respectivamente. Las secuencias recuadradas contienen el palíndromo perfecto (región I) y el palíndromo imperfecto (región II) de *parD*, y las líneas discontinuas indican el eje de simetría de cada secuencia. En azul y subrayados, se muestran los motivos -35 y -10 extendido del promotor, así como el sitio +1 de inicio de la transcripción. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (C y D), que fueron realizados marcando radiactivamente en posición 5' con 32 P los fragmentos de 81 pb (incluye la región I) y de 115 pb (incluye la región II) con 2 nM de ADN y Kis sola (2.4, 4.8 y 9.6 μ M) (líneas 8-10) o en combinación con Kid (2.4 μ M) y Kis (0.3, 0.6, 1.2, 4.8 y 9.6 μ M) (líneas 2-7). La calle 1 presenta el control negativo sin proteínas. Los complejos formados están indicados como cIV, cV, cVI y cVII.

La interacción de los complejos Kid-Kis con las regiones I o II del promotor-operator de *parD*, también se analizó sin marcaje radiactivo mediante EMSA (Figura 17). Para ello, se utilizaron relaciones molares Kis:Kid:ADN 40:40:1 y 20:20:1. Las bandas de retardo cIX y cX, corresponden a complejos Kid-Kis-ADN de tamaño creciente cuya estequiometría se analiza más adelante por espectrometría de masas nativa (sección R3.4). La banda de migración más rápida y menos intensa (cVIII) podría corresponder a la unión de Kis sola a los fragmentos I o II de acuerdo con los controles en las calles 1 y 5. El experimento indica una mayor afinidad de los complejos Kis-Kid por el fragmento conteniendo la región I que por el fragmento conteniendo la región II.

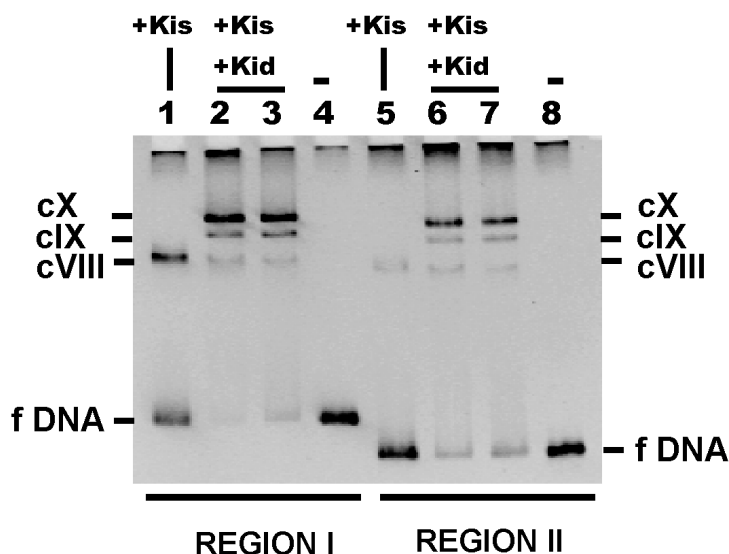


Fig. 17.- Interacción de Kis y de Kis-Kid con los fragmentos de ADN que contienen o la región I o la región II de *parD*. Ensayos de cambio de movilidad electroforética mostrando la unión de Kis sola (7.5 μ M) o complejos Kis-Kid preformados a relaciones molares (1:1); Kis (7.5 o 15 μ M) con la región I o II de *parD* (375 nM). Carril 1 y 5, complejos formados entre Kis y la región I y II respectivamente. Calles 2-3 y 6-7 muestran los complejos formados entre las mezclas equimolares de Kid-Kis (calles 2 y 6 a 15 μ M y calles 3 y 7 a 7.5 μ M) con la región I y II de *parD*, respectivamente. Calles 4 y 8 representan los controles negativos sin proteínas. Los complejos específicos obtenidos están indicados con cVIII, cIX y cX.

Para verificar si el complejo Kis-Kid presenta mayor afinidad por un ADN que contiene la región I (fragmento de 115 pb) con respecto a otro que contiene la región II (fragmento de 81 pb), se realizaron ensayos de retraso en gel, mezclando ambos ADNs marcados radiactivamente en su extremo 5' con 32 P e incubándolos simultáneamente con las proteínas Kis y Kid. Se utilizó una concentración fija de Kid (2.4 μ M) y un gradiente de concentraciones de Kis (0.6, 1.2, 2.4, 4.8 y 9.6 μ M). Para competir las interacciones proteína-ADN de tipo inespecífico, los ensayos se realizaron en presencia de 1 μ g de poli [d(I-C)] (figura 18). La posición del ADN libre o en complejo con las proteínas se determinó mediante autorradiografía. La señal del ADN libre correspondiente al sitio I disminuye más rápidamente que la correspondiente al sitio II indicando que las interacciones ocurren con mayor afinidad en la región I que en la región II. Además los complejos formados en presencia de competidor aparecen cuando la relación molar entre de Kis/Kid es igual o superior a uno (Figura 18).

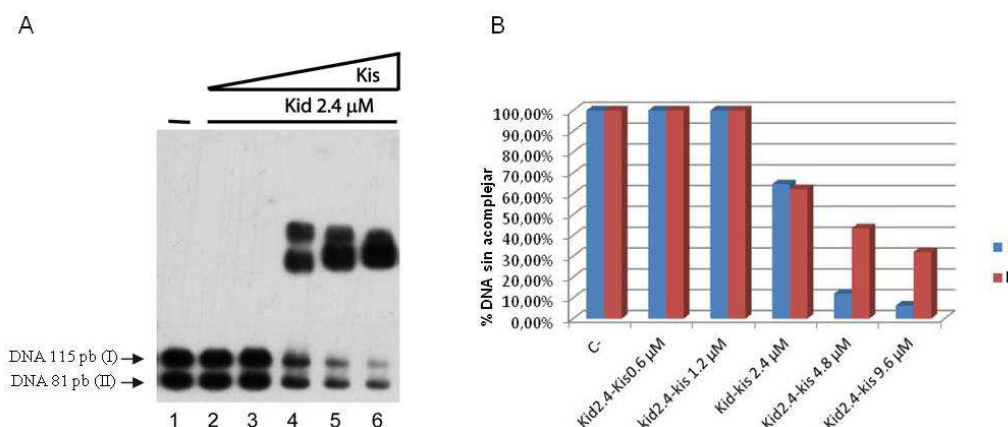


Fig. 18.- Kis y los complejos Kis-Kid presentan más afinidad por la región I que por la región II del promotor *parD*. (A) Los fragmentos de 115 pb (región I) y de 81 pb (región II) fueron marcados con ^{32}P y se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética con los complejos Kis y Kid-Kis. Línea 1 ensayo sin proteínas. Líneas 2-6 concentraciones crecientes de Kis (0.6, 1.2, 2.4, 4.8 y 9.6 μM) con una concentración fija de Kid (2.4 μM). (B) Densitometría del ADN libre correspondiente a los fragmentos I y II según se muestra en A. En azul se muestra el ADN correspondiente al fragmento de 115 pb (región I) y en rojo el fragmento de 81 pb (región II). Notar que la señal de la banda correspondiente a la región I disminuye más rápidamente que la correspondiente a la región II.

De manera similar se compararon las diferentes afinidades de los complejos Kid-Kis formados en exceso de la antitoxina (Kis 9.6 μM y Kid 2.4 μM) por los tres fragmentos de distinto tamaño conteniendo los sitios I y II (fragmento de 174 pb), el sitio I (fragmento de 115 pb) o el sitio II (fragmento de 81 pb). Las posiciones del ADN libre o en complejo con Kid-Kis se detectaron mediante autorradiografía (Figura 19). El análisis de la señal correspondiente a los fragmentos libres sugiere, de manera consistente con el análisis anterior, que el complejo toxina-antitoxina tiene mayor afinidad por el sitio I que por el sitio II. La presencia de los dos sitios permite una titulación completa del fragmento por el complejo toxina-antitoxina.

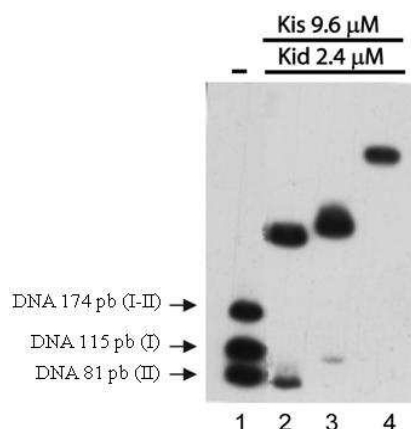


Fig. 19.- Kis y los complejos Kid-Kis interactúan más eficientemente con la región I que con la región II y presenta mayor afinidad por el fragmento que contiene ambas regiones del operón *parD*. Ensayos de cambio de movilidad electroforética con los fragmentos de ADN marcados en su extremo 5' con ^{32}P . Los fragmentos usados fueron de 174 pb (región I y II), 115 pb (región I) y de 81 pb (región II) con los complejos Kis y Kid-Kis. Línea 1, ensayo sin proteínas. Línea 2, fragmento de 81 pb con los complejos Kid-Kis (2.4-9.6 μM). Línea 3, fragmento de 115 pb con los complejos Kis-Kid (2.4-9.6 μM). Línea 4, fragmento de 174 pb con los complejos Kid-Kis (2.4-9.6 μM).

Los contactos específicos de Kis o de los complejos Kid-Kis con el fragmento de 115 pb, que contiene tan sólo el sitio I de mayor afinidad, fueron analizados mediante ensayos de protección frente a radical hidroxilo (figura 20; ver M.2.19). El patrón de protección muestra que las interacciones de Kis (cIV, figura 16 panel A) o de los complejos Kid-Kis (cV, figura 16 panel A) ocurren específicamente en la región I y, además, los contactos que Kis o Kid-Kis establecen con esta región del ADN, son exactamente los mismos. Además, el patrón de protección observado en la región I es similar al obtenido en esta misma región I, cuando los ensayos se realizaron con el fragmento de 174pb, que contiene los dos sitios de unión (I y II) (ver Apartado R.3.2; figura 15).

La afinidad de Kid-Kis por la región I es mayor que por la región II, sin embargo, las protecciones observadas en ambas regiones en el fragmento de 174 pb que contiene las regiones I y II son de similar intensidad. Esto sugiere que la carga del complejo Kid-Kis en la región I podría favorecer de alguna manera no entendida hasta la fecha las interacciones en la región II.

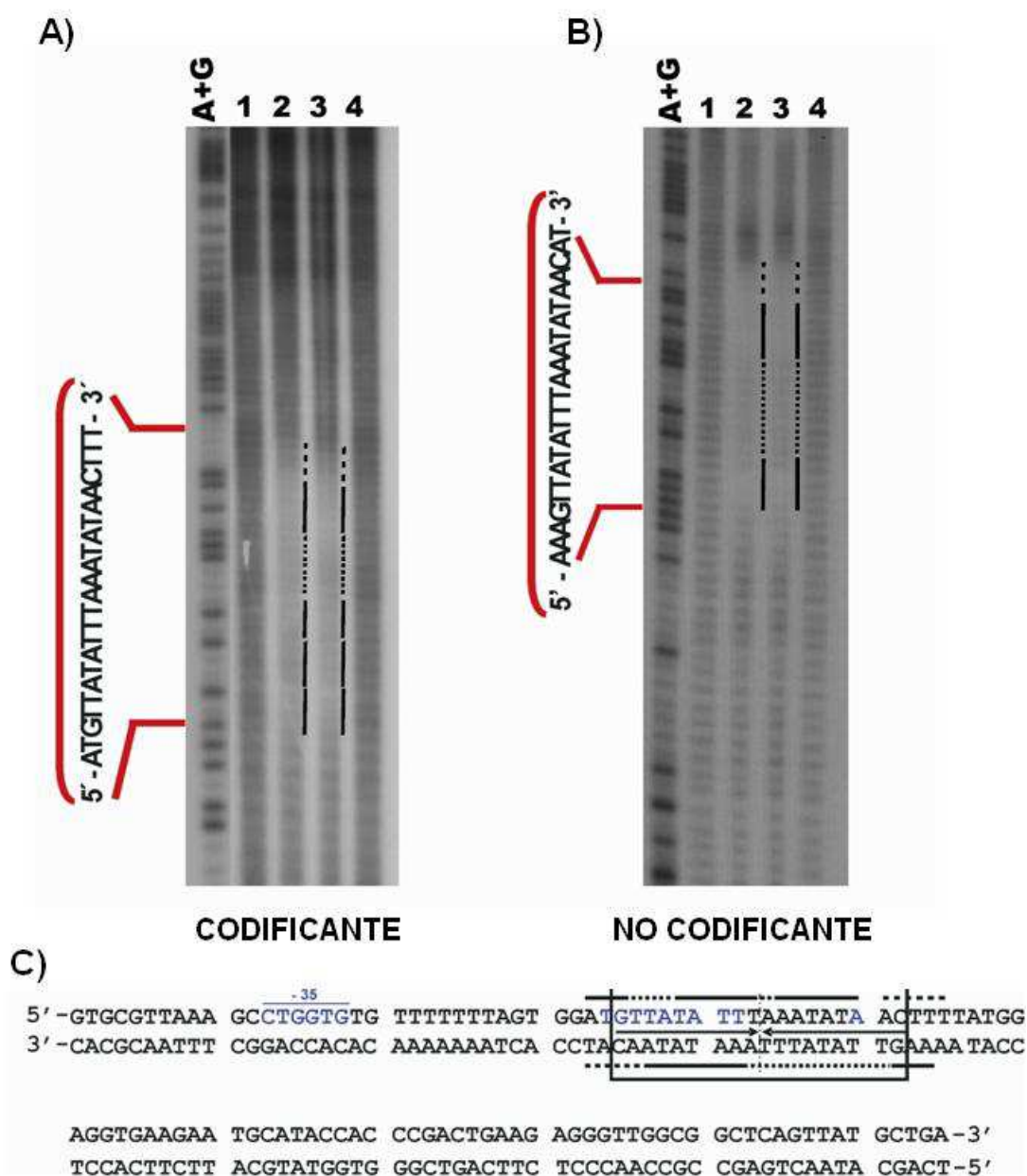


Fig. 20.- Kis y el complejo Kid-Kis interaccionan específicamente con la región I de *parD*, en el fragmento de 115 pb. (A) y (B) Ensayos de protección frente a radical hidroxilo (*footprinting*), realizados con el fragmento de 115 pb que contiene la región I de *parD* (2 nM), en presencia de Kis (4.8 μ M) o una combinación de Kis (4.8 μ M) y Kid (2.4 μ M). Las protecciones observadas tanto en la cadena codificante (A) como en la no codificante (B), se indican con líneas continuas (protecciones fuertes) o discontinuas (protecciones débiles). Los carriles 1 y 4 muestran patrón de corte del ADN en ausencia de proteínas. Los carriles 2 y 3 muestran el patrón de protección observado por la unión de Kis o del complejo Kid-Kis, respectivamente. Se indica la secuencia de la repetición invertida (sitio I), incluida en la región protegida. También se incluye la secuencia de Maxam-Gilbert escalera AG. (C) Resumen de los sitios protegidos en la región *parD* I por Kis y por el complejo Kis-Kid (barras continuas y discontinuas). La región I contiene un elemento de simetría perfecta de 18 pb, que ha sido recuadrado. El eje de simetría de dicha secuencia se indica con línea discontinua. Las bases cuyas desoxirribosas están protegidas por Kis (barras finas) o Kid-Kis (barras gruesas) de la rotura por radical hidroxilo están subrayadas. La secuencia -35, el elemento -10 extendido y el sitio +1 de inicio de la transcripción se encuentran marcados en azul.

R.3.4.- Análisis de las interacciones de Kid-Kis con la región I del promotor-operador de *parD* analizadas mediante Espectrometría de Masas Nativa (EMN).

Los complejos Kis-Kid se han analizado también mediante Espectrometría de Masas Nativa (EMN), con el fin de detectar y determinar en solución la estequiometría de los distintos complejos Kid-Kis libres o unidos al ADN. Estas determinaciones se realizaron en colaboración con el Departamento de Espectrometría de Masas de la Universidad de Utrech, primero por el Dr. Van den Heuvel y luego por uno de los miembros de nuestro equipo, la Dra. Diago Navarro. El análisis inicial se realizó utilizando un fragmento de 30 pb que incluye el sitio de mayor afinidad. La Dra. Diago Navarro extendió el estudio de las interacciones al fragmento de 174 pb que contiene toda la región promotora-operadora del sistema. Esta ampliación supone una aportación importante a la tecnología disponible ya que posibilita un análisis de las interacciones que regulan la expresión de genes a nivel transcripcional en muchos sistemas. Nuestra contribución a este análisis consistió en i) diseñar los experimentos, ii) preparar las muestras de proteínas y de ADN e iii) introducir en la región promotora-operadora las mutaciones que se analizan. Este capítulo termina con la valoración del efecto de las mutaciones sobre la actividad del promotor y sobre la regulación del sistema por las proteínas Kis y Kid realizada por este doctorando.

R.3.4.1.- La antitoxina Kis interacciona como dímero en la región promotora-operadora de *parD*.

Teniendo en cuenta los datos de interacción proteína-ADN en los experimentos de protección que identifican las regiones de interacción de la antitoxina y del complejo toxina-antitoxina en la región promotora-operadora (ver figura 15), se sintetizó un fragmento de 30 pb, que contenía tan sólo la región I del promotor. Este fragmento fue utilizado inicialmente para los estudios de EMN, en lugar del fragmento de 174 pb que contiene los dos sitios; hasta el análisis que se presenta en esta tesis el estudio por espectrometría de masas de complejos proteína-DNA estaba restringido a fragmentos de ADN de 30-35 pb debido a problemas de apantallamiento de la señal.

Datos de EMN obtenidos en colaboración con este trabajo, permitieron estimar, a partir de la relación masa/carga (m/z) de mezclas de proteínas (Kis, Kid o Kid:Kis) y ADN, las masas del ADN libre (18408.3 Da), del monómero de Kis (9687 Da) y del dímero de Kis (19373 Da). La masa que se obtuvo para el ADN de 30 pb coincidió exactamente con la masa teórica. Asimismo, se determinó la masa para el monómero de Kis que también coincidió con la masa calculada independiente, a partir de la secuencia primaria de Kis marcada con ^{15}N unida a una molécula de β -mercaptoetanol, en experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Kamphuis y col., 2007).

Tras la incubación de Kis con el fragmento de 30 pb que contiene la región I, y en un exceso molar de 20 veces con respecto al ADN, el espectro de masas de Kis mostró, claramente, cuatro estados de carga (fig 21 A): se detectaron a 2000 m/z dos series de iones que podrían corresponder al monómero (9687 Da) y al dímero de Kis (19373 Da); y a 4500 m/z otras dos series de iones, con masas estimadas de 57074 y 76431 Da, que corresponden, respectivamente, a los complejos $(\text{Kis}_2)_2\text{-ADN}$ y $(\text{Kis}_2)_3\text{-ADN}$. Cuando

se realizaron los ensayos con un exceso molar de antitoxina de 5 veces con respecto al ADN, se identificaron las señales correspondientes a ADN libre y a los complejos Kis₂-ADN (37801 Da) (fig. 21 B). Como cada complejo de proteína-ADN implica al menos una unidad dimérica de Kis, este análisis indicó que un dímero de Kis es requerido para el reconocimiento de las secuencias en el ADN (sitio I).

Además, el análisis de los datos reveló que la señal de Kis correspondía, mayoritariamente, a la forma libre de la proteína: sólo el 15 % de Kis estaba unido al ADN, mientras que el 85% se encontraba en forma libre. Esto indicaba que la antitoxina Kis interacciona débilmente con la región I del promotor-operador de *parD*. Notar que la ionización y la eficiencia de transmisión es proteína y ADN dependiente, por lo tanto, sólo se pudo realizar una semi-cuantificación de estos datos. Para averiguar si la unión de Kis a la región I de *parD* era específica, se añadió la antitoxina Kis a una solución que contenía un ADN de cadena doble de 30 pb, con una secuencia de nucleótidos al azar. El análisis del espectro de masas indicó que no se había formado ningún complejo proteína-ADN (datos no mostrados), lo que es consistente con que el reconocimiento de la región I de *parD* por Kis requiere la presencia de secuencias de unión específicas.

Para detectar si existía algún tipo de interacción entre la toxina Kid y el fragmento de ADN de 30 pb, que contiene la región I de *parD*, se realizaron ensayos de EMN. La formación de complejos Kid-ADN, se realizó exactamente en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para la formación de los complejos Kis-ADN. Tras el análisis del espectro de masas, no se detectaron relaciones m/z correspondientes a la formación de complejos Kid-ADN. Este resultado es consistente con los datos de EMSA (ver apartado R.3.1), los cuales indicaron que la toxina Kid no interacciona directamente con el ADN.

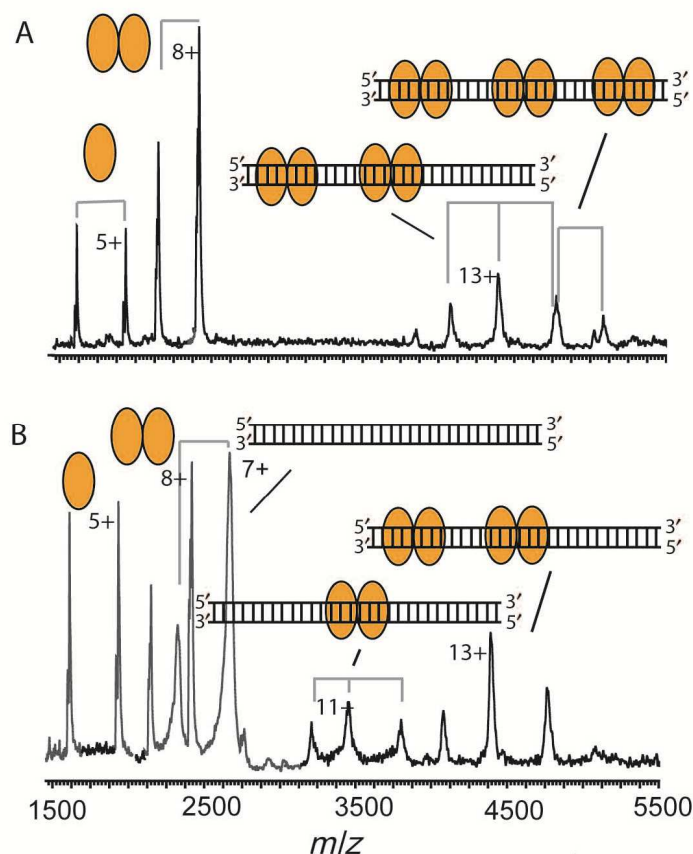


Fig. 21.- Dímeros de la antitoxina Kis interaccionan con la región I del promotor-operator de *parD*. Espectrometría de Masas (EM) Nativa realizada con Kis y un ADN de 30 pb que contiene la región I de *parD*. La formación de los complejos Kis-ADN se realizó mediante la incubación de la proteína y el ADN, a 20°C, durante 5 min, en acetato amónico (50 mM), pH 5.8. **(A)** EMN de Kis:*parD* (región I). Se utilizó una relación Kis:ADN (20:1); Kis (7.5 μ M). **(B)** EMN de Kis:*parD* (región I). Se usó una relación Kis:ADN (5:1); Kis (7.5 μ M). Los monómeros y dímeros de Kis se muestran como elipses naranjas simples o dobles, respectivamente; y el fragmento de ADN que contiene la región I, se muestra como una doble cadena.

R.3.4.2.- Un exceso molar de Kid forma con Kis complejos hetero-hexaméricos Kid₂-Kis₂-Kid₂ en el fragmento de ADN de 30 pb que lleva la región I.

Los ensayos de cambio de movilidad electroforética (apartado R.3.1), mostraron que, dependiendo de la relación Kid:Kis, se forman diferentes complejos Kid-Kis-ADN (promotor-operator de *parD*). Sin embargo, estos ensayos no permiten la determinación de la estequiometría de los complejos formados. Por lo tanto, para estudiar definir los complejos proteína-DNA que intervienen en la interacción con el fragmento de 30 pb que contiene la región I, se realizaron ensayos de EMN.

Los resultados del análisis indicaron que cuando se realiza una mezcla de Kid:Kis, a una relación molar 2:1, se forman hetero-trímeros Kid₂-Kis (33820 Da) y hetero-hexameros Kid₂-Kis₂-Kid₂ (67716 Da) (figura 22 panel A). Tras la adición del

fragmento de 30 pb (que contiene la región I), y utilizando una relación molar Kid:Kis:ADN 80:40:1, se observaron cambios en el espectro de masas (figura 22 panel B); el equilibrio trímero-hexámero se desplazó hacia el hexámero y la región I de *parD* interaccionó con los complejos Kid-Kis. El espectro de masas mostró diferentes series de iones, y la determinación de masas reveló que estas series de iones representan: dímeros de Kid libres, hetero-trímeros libres ($\text{Kid}_2\text{-Kis}$), hetero-hexámeros libres ($\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2$) y hetero-hexámeros y multímeros de hetero-hexámeros unidos al ADN tales como: $(\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2)_2\text{-(DNA)}_1$ (153968 Da) y $(\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2)_3\text{-(DNA)}_1$ (221957 Da). Curiosamente, en esta mezcla, aproximadamente, la mitad de los complejos Kid-Kis (valor relativo del 57%) no estaban unidos al ADN. Estos resultados muestran que se requiere al menos un dímero de antitoxina para la unión a la región I del promotor-operador de *parD*, incluso cuando la toxina Kid está presente. Por lo tanto, un dímero de antitoxina es la unidad mínima de interacción con el ADN. Dado que la presencia de la región I de ADN provoca el cambio de trímero a hexámero, se propone que este desplazamiento es producido por interacciones de los complejos Kid-Kis con el promotor-operador de *parD*.

A continuación, se mezcló el fragmento de 30 pb, conteniendo el sitio I, con Kid y Kis a una relación molar Kid:Kis:ADN (20:10:1) (figura 22 panel C). El espectro de masas mostró dos grandes series de iones de proteína correspondientes a hetero-hexámero libre ($\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2$) y hetero-hexámero unido al ADN ($\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2$) a una estequiometría de 1:1 (86077 Da), es decir, una molécula de ADN por hetero-hexámero. Estos datos muestran, claramente, que al aumentar la concentración del ADN con relación a Kis hay una unión de un solo hetero-hexámero al ADN. Por otra parte, la gran cantidad de hetero-hexámero libre $\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2$ (abundancia relativa del 80%), indica una baja afinidad del complejo hexamérico con el ADN. Estos resultados son consistentes con el hecho de que los complejos Kid-Kis formados con el fragmento de 174 pb (región promotora-operadora completa) en exceso de la toxina Kid, puedan ser fácilmente competidos con poli [d(I-C)].

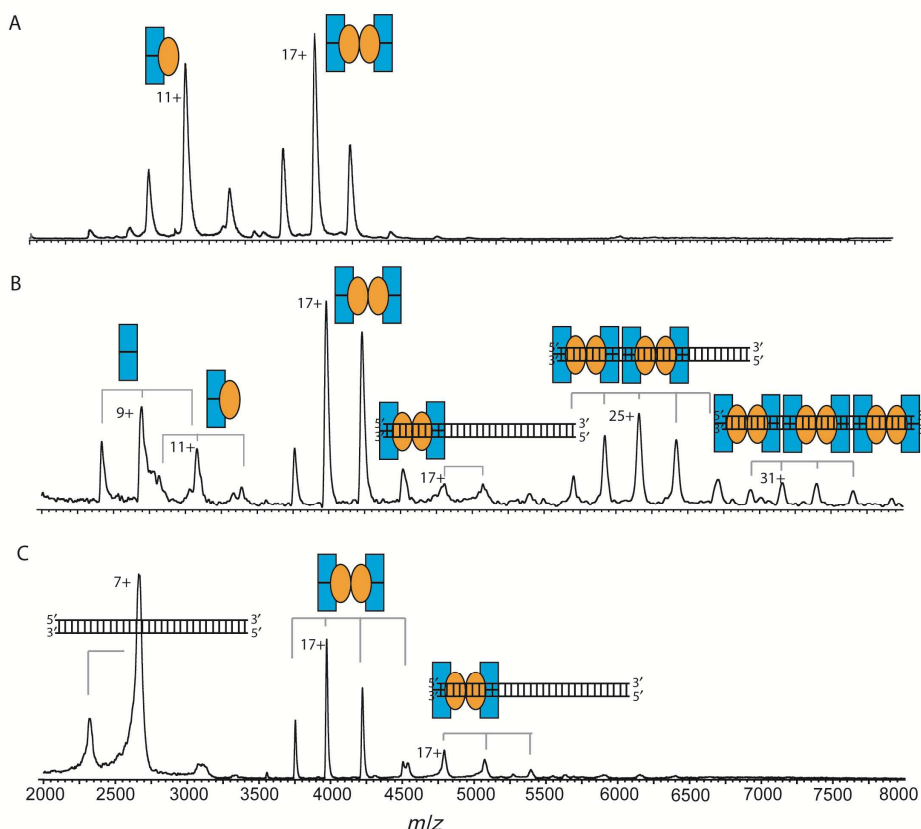


Fig. 22.- Los complejos Kid-Kis (relación molar 2:1) interaccionan con la región I de *parD*. EMN fue realizada con los complejos Kid-Kis y Kid-Kis-ADN-*parD* en acetato amónico (50 mM) pH 5.8. (A) EMN, realizada con Kis y Kid, utilizando relaciones molares de Kid:Kis (2:1), siendo Kis (7,5 μ M). (B) y (C) EMN realizada utilizando relaciones molares Kid:Kis:ADN-*parD* (80:40:1 en B) y (20:10:1, en C); Kis (7,5 μ M), en B y C. Kid y Kis se indican con rectángulos azules y elipses naranjas, respectivamente; y el fragmento de ADN (30 pb) con doble cadena. Cada complejo está representado por una combinación apropiada de rectángulos, elipses y/o doble cadena de ADN.

R.3.4.3.- Una relación equimolar toxina:antitoxina forma complejos hetero-octaméricos estables en el fragmento de ADN de 30 pb que lleva la región I.

Anteriormente, se ha mostrado que al mezclar Kid y Kis a una relación molar 1:1, se observa la formación de múltiples complejos: hetero-trímeros Kid₂-Kis (43450 Da), hetero-hexámeros Kid₂-Kis₂-Kid₂ (67722 Da) y hetero-octámeros Kis₂-Kid₂-Kis₂-Kid₂ (87120 Da) (figura 23A). Posteriormente, se realizó el experimento mezclando Kid y Kis con el fragmento de ADN de 30 pb, utilizando una relación molar 40:40:1. Tras el análisis del espectro de masas se observaron tres series de iones (figura 23B). La determinación de las masas de las especies detectadas reveló la presencia de una baja cantidad de hetero-hexámero libre (Kid₂-Kis₂-Kid₂), con una abundancia relativa del 17% (67675 Da), y una alta cantidad de ADN unido al complejo hetero-octamérico Kis₂-Kid₂-Kis₂-Kid₂-*parD* ADN (76%) (105535 Da); así como complejos Kis₂-Kid₂-Kis₂-Kid₂-*parD* DNA (7%) (124563 Da). Por lo tanto, la adición de la región I de *parD* a una relación molar Kid:Kis 1:1, induce un fuerte efecto cooperativo entre la unión del ADN y la octamerización de Kid-Kis. Este efecto cooperativo fue mayor cuando la concentración de ADN en solución se aumentó 4 veces. Bajo estas condiciones, los complejos hetero-hexaméricos libres desaparecieron completamente, y

la especie más abundante fue el octámero $\text{Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-parD}$ DNA (abundancia relativa del 88%) (figura 23 C). No se observaron cambios en el espectro de masas cuando se aumentó aún más la concentración del ADN de *parD*. Estos datos demostraron que el incremento en la concentración relativa de Kis con respecto a Kid, incrementa la afinidad de los complejos Kid-Kis por el ADN, y sugiere que la especie reguladora es el hetero-octámero ($\text{Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2$).

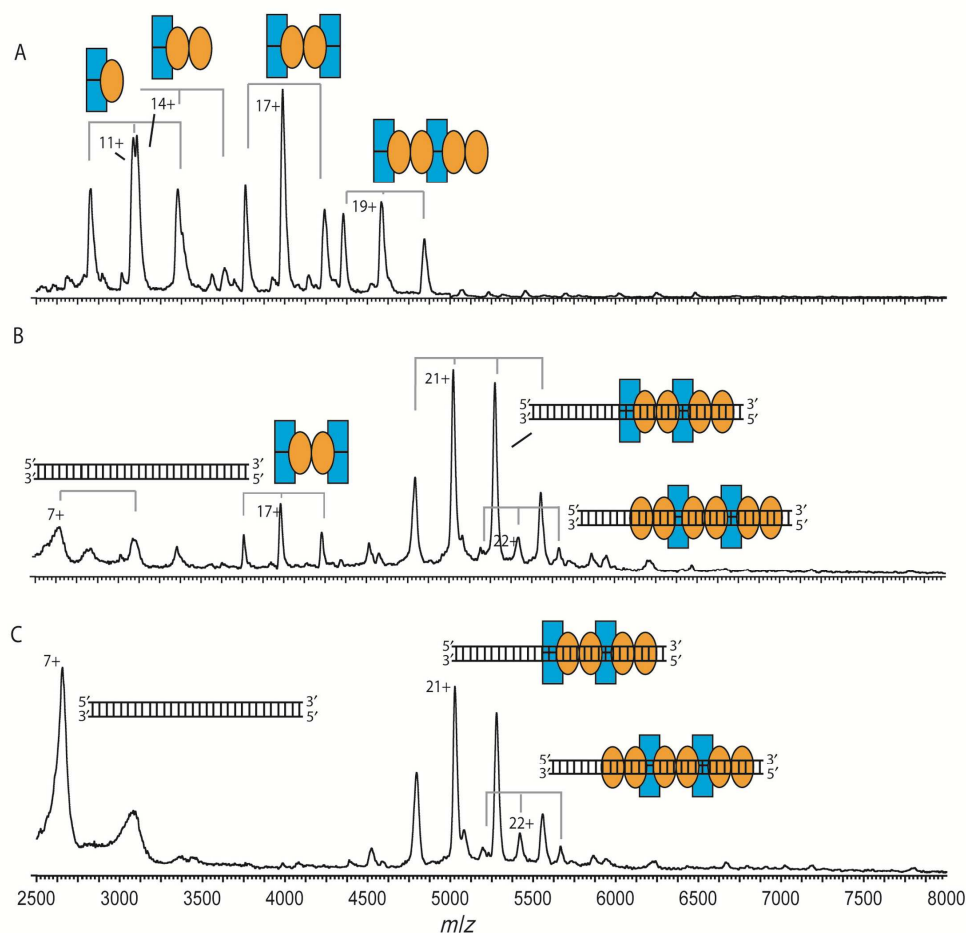


Fig. 23.- Complejos Kid-Kis (relación molar 1:1) interaccionan eficientemente con la región I de *parD*. Espectrometría de masas nativa realizada con complejos Kid-Kis y con complejos Kid-Kis-*parD* ADN en acetato amónico (50 mM), pH 5.8. (A) EMN realizada a partir de una mezcla de Kid:Kis (1:1); (Kis 15 μM). (B) y (C) EMN de los complejos Kid:Kis:*parD* obtenidos a relaciones molares 40:40:1 (B) y 10:10:1 (C); Kis (15 μM), en ambos ensayos (B y C). Kid y Kis están indicados en rectángulos azules y elipses naranjas, respectivamente. El fragmento de ADN de 30pb está representado con una doble hélice. Cada complejo está representado por una combinación de rectángulos, elipses y/o ADN de doble cadena.

R.3.4.4.- Resumen.

1.- La antitoxina interacciona como dímero y de manera específica con el fragmento de 30 pb que incluye el sitio I.

2.- El hetero-octámero Kid₂-Kis₂-Kid₂-Kis₂ es la especie que une este ADN con mayor eficiencia. Esta especie se forma en exceso de la antitoxina.

3.- En exceso de la toxina Kid se forma un hetero-hexamero Kid₂-Kis₂-Kid₂ que, en presencia del fragmento de 30 pb, se une al ADN pero de manera menos eficiente que el hetero-octámero.

4.- A la luz de los experimentos de protección, los datos de espectrometría de masas indican que la antitoxina o el complejo Kis-Kid formado en exceso de la antitoxina, contactan con las dos ramas de la repetición invertida interna que contiene el sitio I.

R.3.4.5.- Propuestas.

1.- En el hetero-octámero los contactos con el ADN ocurre en la repetición invertida del sitio I y se hacen a través de dos dímeros de antitoxina unidos por un dímero de toxina; este dímero estabiliza la interacción de la antitoxina con el AND y actúa también como un espaciador que posiciona cada dímero de antitoxina sobre cada una de las ramas de la repetición invertida del sitio de unión.

2.- La menor eficiencia de unión al AND del hetero-hexámero, que se forma en exceso de la toxina, se debe a que solo interacciona en una de las ramas del palíndromo invertido a través de un dímero de antitoxina.

3.- El hetero-octámero es el represor principal. En exceso de la toxina el sistema se desregula, debido a la formación de complejos con baja eficiencia de unión al ADN, y los niveles de la antitoxina vuelven a recargarse.

R.3.5.- EMN de complejos de Kid-Kis con un fragmento de 174 pb que contiene la región promotora-operadora de *parD* y que incluye los sitios I y II de interacción del represor.

La extensión del análisis de EMN previamente realizado con un fragmento de ADN de 30 pb, que contenía tan sólo la región I, a un fragmento de 174 pb, que contenía las regiones I y II, (realizada por la Dra. Elizabeth Diago Navarro en colaboración con este trabajo), permitió analizar simultáneamente las interacciones de las proteínas Kis y Kid en toda la región promotora-operadora del sistema, así como la evaluación de mutantes que afectan al sitio I y/o al sitio II. En el análisis, además del fragmento conteniendo la secuencia silvestre, se realizó introduciendo mutaciones en dicho fragmento que cambiaban: i) la zona izquierda, centro y derecha de la región II; ii) cinco bases de la región I que no incluyen a los elementos conservados del promotor o iii) combinaciones entre las mutaciones introducidas en diferentes posiciones en el interior del sitio II con las mutaciones introducidas en el sitio I. Se analizaron la estequiometría de los complejos moleculares formados por Kid y Kis a distintas relaciones entre las proteínas, sobre el promotor-operador del sistema. El análisis permitió valorar la contribución de los sitios I y II a las interacciones de la toxina y la antitoxina en dicha región.

R.3.5.1.- EMN de complejos Kid-Kis con el fragmento de 174 pb conteniendo la región promotora-operadora silvestre.

Consistentemente con los resultados obtenidos utilizando el fragmento de 30 pb conteniendo tan solo el sitio I (apartado R.3.4), las especies moleculares detectados mediante EMN en presencia de un fragmento de 174 pb que contiene los sitios I y II, y de las proteínas del sistema, depende de la relación molar entre estas proteínas: en exceso de la toxina (Kid:Kis 2:1) se detectó un hetero-hexamero ($\text{Kid}_2\text{Kis}_2\text{Kid}_2$) unido al ADN. También se detectó una abundancia de hetero-hexámero libre que es consistente con la baja afinidad de este complejo por el operador del sistema. Es probable que la especie unida al ADN, lo esté en una de las dos ramas del sitio de mayor afinidad I, que contiene una repetición invertida e interna perfecta.

A una relación (Kid:Kis) 1:2, esto es, en exceso de la antitoxina, el perfil de las especies detectadas en presencia del ADN cambia. Se detectaron: ADN libre, hetero-octámero libre ($\text{Kis}_2\text{Kid}_2\text{Kis}_2\text{Kid}_2$), hetero-hexámero libre ($\text{Kid}_2\text{Kis}_2\text{Kid}_2$) y dos hetero-octármeros unidos al ADN. Es previsible que los complejos con dos hetero-octármeros unidos, contengan un hetero-octámero unido en la región I y otro en la región II (figura 24, panel C). Así mismo a una relación 1:1 de Kid:Kis se detectaron las siguientes especies moleculares: ADN libre, hetero-octámero libre ($\text{Kis}_2\text{Kid}_2\text{Kis}_2\text{Kid}_2$), hetero-hexámero ($\text{Kid}_2\text{Kis}_2\text{Kid}_2$) libre, un hetero-octármero unido al ADN y dos hetero-octármeros unidos al ADN (figura 24, panel B).

En base a estos resultados, se propone que un solo hetero-octámero estaría unido bien a la región I o bien a la región II, y que el doble hetero-octámero estaría unido simultáneamente en los sitios I y II mediante sus antitoxinas. Este complejo se detecta tan sólo cuando existe una relación equimolar Kis:Kid o en exceso de antitoxina (Figura 24 paneles B y C), proponiéndose que éste sería el complejo regulador del sistema.

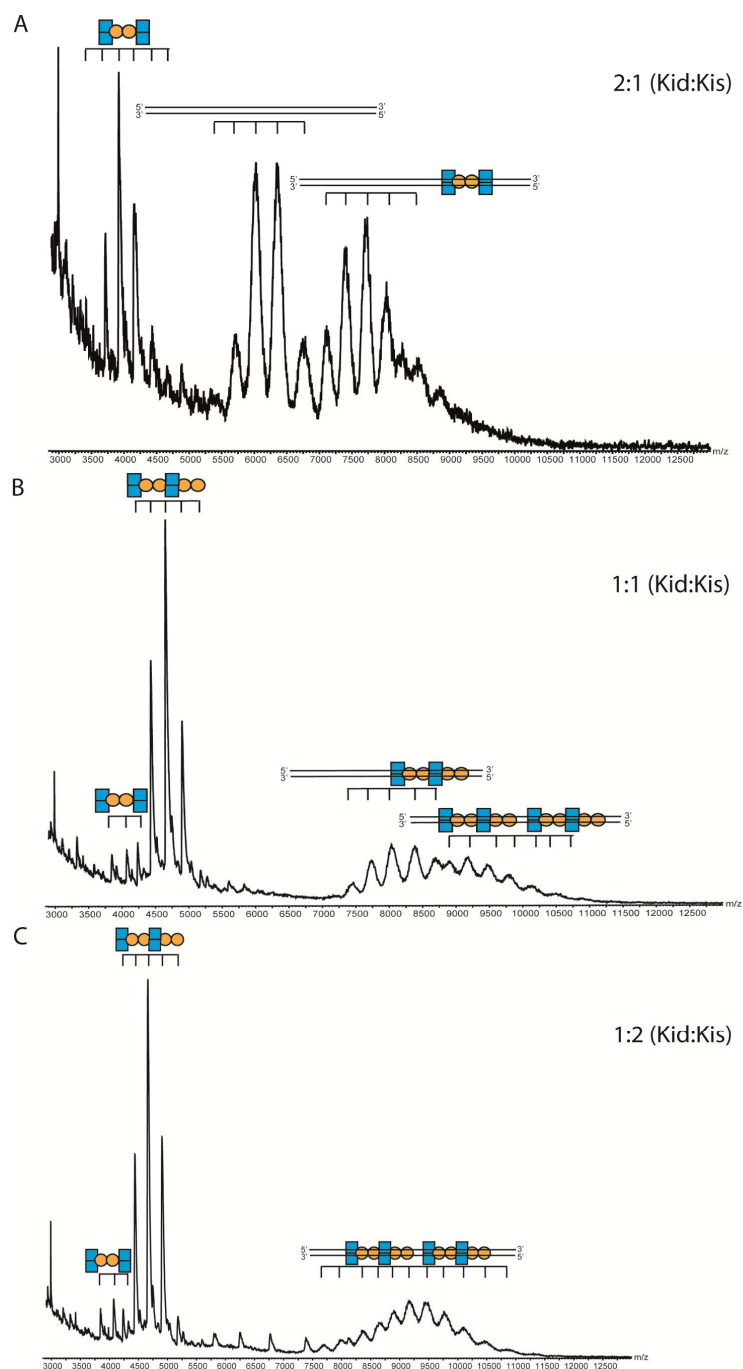


Fig. 24.- Analisis por EMN de los complejos Kid-Kis formados en presencia del fragmento de 174 pb conteniendo la región promotora-operadora de *parD*. Se utilizaron distintas relaciones molares de Kid y Kis y una concentración de ADN de 0.3 μ M (A) Complejos formados en presencia de 20 μ M de Kid y 10 μ M de Kis (relación Kid:Kis 2:1). (B) Complejos formados en presencia de 10 μ M de Kid y 10 μ M de Kis (relación Kid:Kis 1:1). (C) Complejos formados en presencia de 10 μ M de Kid y 20 μ M de Kis (relación Kid:Kis 1:2). En A, B y C el monómero de Kid se muestra con un cuadrado azul y el de Kis con un círculo amarillo. El fragmento de ADN se indica con una doble hebra. Los complejos se representan con una combinación apropiada de cuadrados, círculos y de doble hebra.

R.3.5.2.- EMN de complejos Kid-Kis con el fragmento de 174 pb conteniendo la región II mutada.

Con el fin de analizar la contribución del sitio II en la interacción de las proteínas del sistema con la región promotora-operadora de *parD*, se realizó también el análisis de EMN sobre un fragmento mutado en el sitio II (mutante II-C6), pero que conservaba la secuencia silvestre del sitio I. Para ello, se introdujeron mutaciones en la secuencia de ADN correspondiente al sitio II (marcadas en negrita): GTTTGGTTGAATTCCCTA TTTGCGCGGGGAGTTGTGCGTT. Se realizaron ensayos de EMN, utilizando este ADN y distintas relaciones Kid:Kis. De nuevo las especies macromoleculares detectadas dependen de la relación entre las proteínas del sistema. A una relación Kid:Kis (1:1) se detectaron ADN libre, hetero-octámero libre ($Kis_2Kid_2Kis_2Kid_2$), hetero-tetrámero libre (Kis_2Kid_2), hetero-hexámero libre ($Kid_2Kis_2Kid_2$), y un hetero-octámero unido al ADN (figura 25, panel A). Se propone que el hetero-octámero, estaría unido al ADN en la región I, ya que esta región aún conserva la secuencia de ADN silvestre, y es la secuencia por la que el complejo Kid-Kis presenta afinidad (ver apartado R.3.3); esta región I tiene accesible las dos ramas de la repetición interna para la interacción de los dos dímeros de antitoxina del hetero-octámero.

Así mismo cuando la relación Kid:Kis fue 1:2, se detectaron ADN libre, hetero-octámero libre ($Kis_2Kid_2Kis_2Kid_2$) y un hetero-octámero unido al ADN. Como se ha indicado en el párrafo anterior, proponemos que el hetero-octámero se une a la región I del promotor-operador, que es la de mayor afinidad y cuya secuencia no está alterada por mutaciones. La unión de un solo octámero Kid-Kis permitiría una regulación parcial del sistema (ver sección R.3.6).

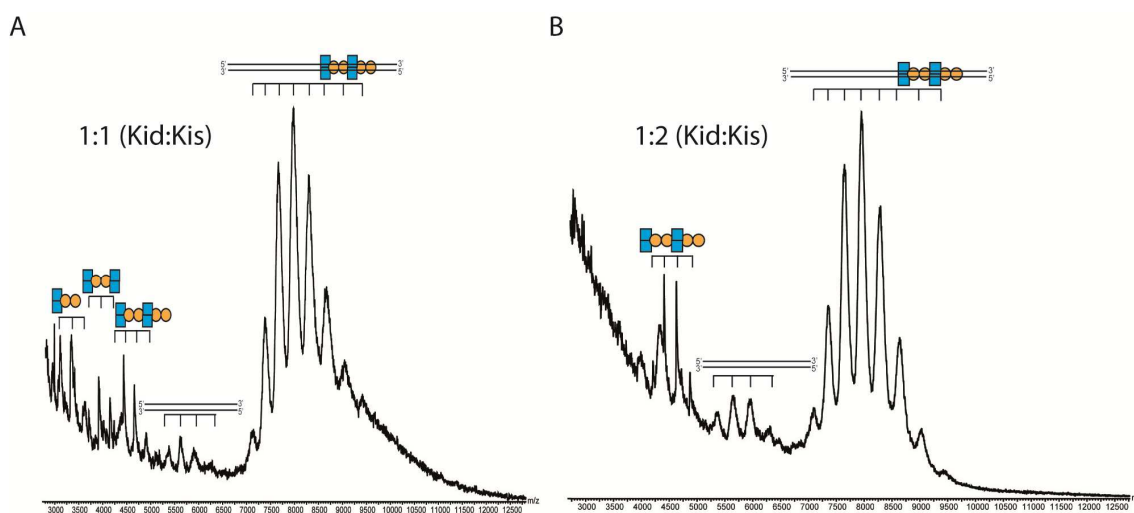


Fig. 25.- Analisis por EMN de los complejos Kid-Kis formados en presencia del fragmento de 174 pb conteniendo la región promotora-operadora de *parD* conteniendo la mutación II-C6. Se utilizaron distintas relaciones molares de Kid y Kis y una concentración de ADN de 0.3 μ M (A) Complejos formados en presencia de 10 μ M de Kid y 10 μ M de Kis (relación Kid:Kis 1:1). (B) Complejos formados en presencia de 10 μ M de Kid y 20 μ M de Kis (relación Kid:Kis 1:2). El monómero de Kid se muestra con un cuadrado azul y el de Kis con un círculo amarillo. El fragmento de ADN se indica con una doble hebra. Los complejos se representan con una combinación apropiada de cuadrados, círculos y de doble hebra.

R.3.5.3.- EMN de complejos Kid-Kis con el fragmento de 174 pb conteniendo la región I mutada.

Con el fin de analizar la contribución del sitio I en la interacción de las proteínas del sistema con la región promotora-operadora completa, se realizó el análisis de EMN con el fragmento de 174 pb conteniendo mutaciones en las bases de la región I, que a continuación se señalan en negrita: AGTGGATGTTATATTCTTT**GCGCGTA**ACTTTTATGGAGG. Los cambios introducidos, con respecto a la secuencia silvestre, afectan a la rama derecha de la repetición invertida, y no a la caja -10 extendida del promotor, ni al sitio +1 de inicio de la transcripción, evitando así una inactivación del promotor. Las especies macromoleculares detectadas por EMN en presencia de Kid y Kis a una relación de 1:1 y de este ADN mutado fueron: ADN libre, hetero-octámero libre ($Kis_2Kid_2Kis_2Kid_2$), y un hetero-octámero unido al ADN. Se propone que el hetero-octámero, que es la especie reguladora, se estaría uniendo en la región II que mantiene la secuencia operadora silvestre (figura 26, panel A). Así mismo, cuando se utilizaron las proteínas Kid y Kis a una relación 1:2, en el espectro de EMN se detectaron: ADN libre, hetero-octámero libre ($Kis_2Kid_2Kis_2Kid_2$), un hetero-hexámero libre ($Kid_2Kis_2Kid_2$) y un hetero-octámero unido al ADN (figura 26, panel B). De nuevo, se propone que el hetero-octámero que es la especie reguladora, se estaría uniendo en la región II, que no había sido mutada y por tanto estando disponible para la interacción con el complejo Kid-Kis. Las mutaciones introducidas en esta región del sitio I, afectan parcialmente la regulación del sistema, indicando su contribución a la regulación del promotor *parD* (ver resultados en la sección R.3.6).

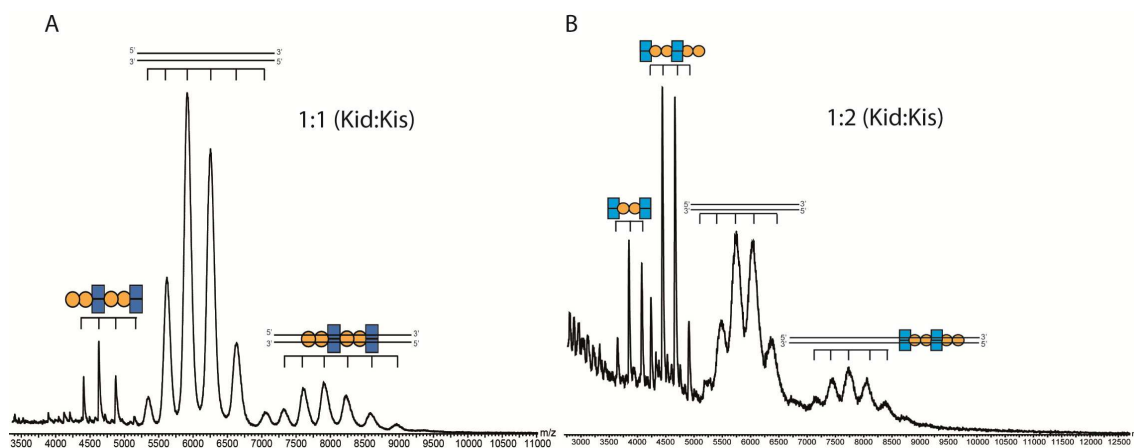


Fig. 26.- Analisis por EMN de los complejos Kid-Kis formados en presencia del fragmento de 174 pb conteniendo la región promotora-operadora de *parD* con mutaciones en la región I (mutante I-I). Se utilizaron distintas relaciones molares de Kid y Kis y una concentración de ADN de 0.3 μ M. (A) Complejos formados en presencia de 10 μ M de Kid y 10 μ M de Kis (relación Kid:Kis 1:1). (B) Complejos formados en presencia de 10 μ M de Kid y 20 μ M de Kis (relación Kid:Kis 1:2). El monómero de Kid se muestra con un cuadrado azul y el de Kis con un círculo amarillo. El fragmento de ADN se indica con una doble hebra. Los complejos se representan con una combinación apropiada de cuadrados, círculos y de doble hebra.

R.3.5.4.- EMN con el fragmento de 174 pb que contiene las regiones I y II mutadas.

Finalmente, se realizó el análisis de EMN con un fragmento de 174 pb conteniendo mutaciones simultáneas en las regiones I y II. La secuencia de ADN mutada en los sitios I y II se corresponde con las descritas en los apartados R.3.5.2 y R.3.5.3. Se detectaron distintas especies moleculares libres o unidas al ADN, dependiendo de las relaciones de Kid y Kis, utilizadas en el ensayo. En presencia de concentraciones equimolares de Kid y Kis, las especies detectadas fueron (figura 27, panel A): ADN libre, hetero-hexámero libre (Kid_2Kis_2Kid) y un hetero-hexámero unido al ADN. Se propone que el hetero-hexámero se une a la región I, a través de un dímero de Kis en la rama izquierda del palíndromo del sitio I, que es la que no está alterada por los cambios de secuencia. Esta interacción es menos eficiente que la del hetero-octámero, que requiere la disponibilidad de secuencias silvestres en las dos ramas de cada una de las repeticiones invertidas que constituyen los sitios I y II.

Así mismo cuando se realizó la EMN con este doble mutante, en los sitios I y II, utilizando Kid:Kis a una relación 1:2 (exceso de antitoxina), se detectaron (figura 27 panel B): ADN libre y un hetero-hexámero unido al ADN. Como en el caso anterior se propone que el hetero-hexámero se estaría uniendo en la región I, ya que ésta contiene una rama del palíndromo con secuencia silvestre. El dato contrasta con la entrada de uno o dos hetero-octámeros cuando la secuencia del ADN no está mutada. Debido a la baja afinidad del hetero-hexámero por el ADN se predice que, en el doble mutante, el sistema estaría desregulado y el nivel de desregulación sería mayor que el que se observaría en los mutantes afectados solo en uno de los dos sitios (I o II) que componen la región promotora-operadora de *parD* (ver sección R.3.6).

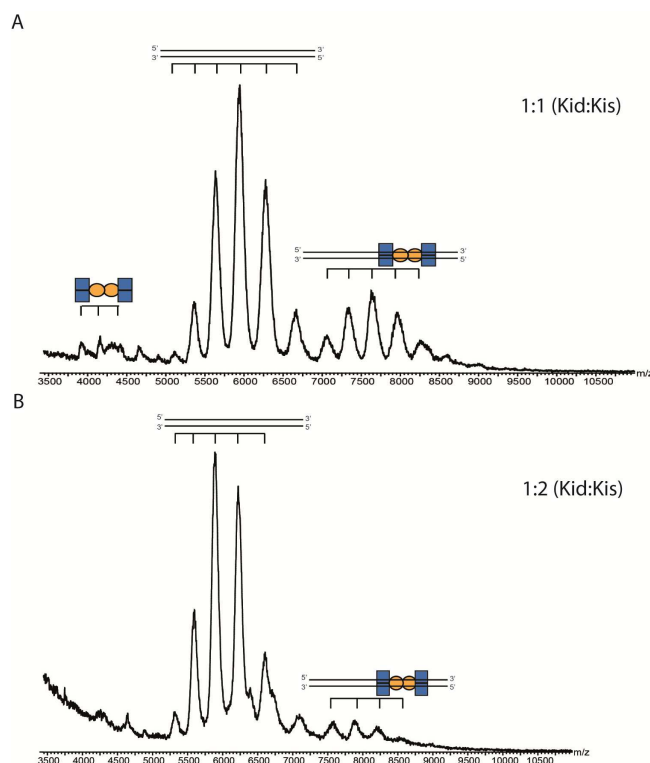


Fig. 27.- Analisis por EMN de los complejos Kid-Kis formados en presencia del fragmento de 174 pb conteniendo la región promotora-operadora de *parD* con mutaciones en la región I (mutante I-I) y en la región II (mutante II-C6). Se utilizaron distintas relaciones molares de Kid y Kis y una concentración de ADN de 0.3 μ M (**A**) Complejos formados en presencia de 10 μ M de Kid y 10 μ M de Kis (relación Kid:Kis 1:1). (**B**) Complejos formados en presencia de 10 μ M de Kid y 20 μ M de Kis (relación Kid:Kis 1:2). El monómero de Kid se muestra con un cuadrado azul y el de Kis con un círculo amarillo. El fragmento de ADN se indica con una doble hebra. Los complejos se representan con una combinación apropiada de cuadrados, círculos y de doble hebra.

R.3.5.5.- Resumen.

- 1.- El hetero-octámero Kid₂-Kis₂-Kid₂-Kis₂ es la especie que se une en el sitio I y/o en el sitio II, en exceso de la antitoxina.
- 2.- En exceso de la toxina se forma un hetero-hexamero Kid₂-Kis₂-Kid₂ que se une en el sitio I o en el sitio II pero de manera menos eficiente que el hetero-octámero.
- 3.- Mutaciones introducidas en el sitio I o en el sitio II, permiten la interacción de un sólo hetero-octámero, probablemente, uniéndose en el sitio no mutado.
- 4.- Mutaciones en los sitios I y II, no permiten la interacción del hetero-octámero. Tan sólo permiten una interacción ineficiente del hetero-hexámero en la única rama disponible en el sitio II.

R.3.5.6.- Propuestas.

Los datos obtenidos mediante espectrometría de masas son compatibles con el papel de la dosis relativa de la toxina y de la antitoxina en la regulación del sistema *parD*. Se propone que el hetero-octámero es la especie reguladora y que el hetero-hexámero aunque puede unirse al ADN, posiblemente en el sitio I, lo hace muy ineficientemente. Por tanto, el hetero-hexámero podría jugar un papel más específico en la neutralización de la toxina.

R.3.6.- Implicación de las regiones I y II en la regulación transcripcional *in vivo* del sistema *parD* mediante ensayos de β -galactosidasa.

Con el fin de correlacionar el papel de los sitios I y II con la regulación del promotor *parD*, las mutaciones en los sitios I y II se introdujeron mediante mutagénesis en un vector mini-F que contenía la región promotora-operadora del sistema *parD* fusionada transcripcionalmente al gen *lacZ* (recombinante pMLM132). Para evaluar el efecto de las distintas mutaciones en la regulación del promotor *parD*, mediada por las proteínas del sistema, se determinaron los niveles de expresión del gen *lacZ* (pMLM132), en presencia del vector pBR322 o de un recombinante pBR322-*parD*_{wt} (pAB24).

Las mutaciones introducidas en la región II cambian al menos 5 pb de la secuencia de la rama izquierda, centro y derecha de la repetición invertida. Usando el mismo método, se cambiaron 5 pb en la secuencia de la rama derecha del palíndromo perfecto incluido en la región I, que no afectaban ni a la secuencia del elemento -10 extendido, ni a la posición +1 de inicio de la transcripción. Así mismo, se construyeron dobles mutantes que consistieron en combinaciones de las mutaciones introducidas en la región II con las mutaciones introducidas en la región I. Los cambios introducidos en la secuencia de los sitios I o II, se muestran en la siguiente tabla (tabla 8), y se indican en negrita:

Tabla 8.- Cambios introducidos en la secuencia de los sitios I y II del PO de *parD*. Se muestra en negrita las bases cambiadas.

Nombre mutante	Secuencia 5' a 3'	Región mutada
II-I	GTTTGGTTGAATT CC CTATT TTTATTAAACATTGTGCGTT	Zona izquierda de la región II del promotor-operador <i>parD</i> del plásmido pMLM132
II-D	GTTTTTGAAAGTTATATTTTT ATT GGG AGTTGTGCGTT	Zona derecha de la región II del promotor-operador <i>parD</i> del plásmido pMLM132
II-ID	GTTTGGTTGAATT CC CTATTT TTATT GGG AGTTGTGCGTT	Zona izquierda-derecha de la región II del promotor-operador <i>parD</i> del plásmido pMLM132
II-DC	GTTTGGTTGAATT CC CTATT TGCGCGGGGAGTTGTGCGT T	Zona derecha-centro de la región II del promotor-operador <i>parD</i> del plásmido pMLM132

II-C6	GTTTGGTTGAATTCCCTCGC TTCGCTGGGAGTTGTGCGTT	Zona centro de la región II del promotor-operador <i>parD</i> del plásmido pMLM132
II-IC	GTTTGGTTGAATTCCCGCG CGTTATTGGGAGTTGTGCGT T	Zona izquierda-centro de la región II del promotor-operador <i>parD</i> del plásmido pMLM132
II-DN	GTTTGGTTGAAAGTTATATT TTTATTTTCTCTTGTGCGTT	Zona derecha de la región II del promotor-operador <i>parD</i> del plásmido pMLM132
II-IDN	GTTTGGTTGAATTCCCTATT TTTATTTTCTCTTGTGCGTT	Zona izquierda-derecha de la región II del promotor-operador <i>parD</i> del plásmido pMLM132
II-IDC	GTTTGGTTGAAAGTTAGCGC GGCGCGAAACAATTGTGCG TT	Zona izquierda-derecha-centro de la región II del promotor-operador <i>parD</i> del plásmido pMLM132
I	AGTGGATGTTATATTCTTTG CGCGTAACTTTTATGGAGG	Zona izquierda de la región II del promotor-operador <i>parD</i> del plásmido pMLM132

R.3.6.1.- Actividad β -galactosidasa de los mutantes en la región II del promotor-operador del sistema *parD*.

Se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa con el plásmido pMLM132-*parD* *wt* y sus derivados (conteniendo mutaciones en la región II) en presencia del vector pBR322. Los resultados mostraron que todos los mutantes analizados tenían afectada la actividad promotora en mayor o menor medida (figura 28, barras azules). Los mutantes que contenían cambios en la secuencia de la zona centro y en la rama derecha del palíndromo del sitio II (mutantes II-IC, II-DC y II-C6) tienen disminuida su actividad promotora (menores niveles de expresión del gen *lacZ*) con respecto del resto de los mutantes analizados, lo que indica que los cambios interfieren en alguna medida con la actividad de la RNA polimerasa. Estos valores se utilizaron como referencia para valorar el efecto de las proteínas del sistema, es decir, indican el máximo valor de expresión del gen *lacZ* fusionado con cada uno de los promotores utilizados (con secuencia silvestre o mutada). Los valores relativos de expresión del gen *lacZ* obtenidos en presencia del recombinante pAB24 (pBR322-*parDwt*) corresponden al efecto de las mutaciones sobre la regulación del sistema (figura 28, barras rojas) e indican que todos los mutantes en la región II se encuentran parcialmente reprimidos. Estos datos sugieren que la región II contiene regiones implicadas en la interacción del represor con la ARN polimerasa. El hecho de que el promotor este parcialmente activado indica que la interacción del represor en dicho sitio es necesaria pero no suficiente para la represión basal del promotor *parD*.

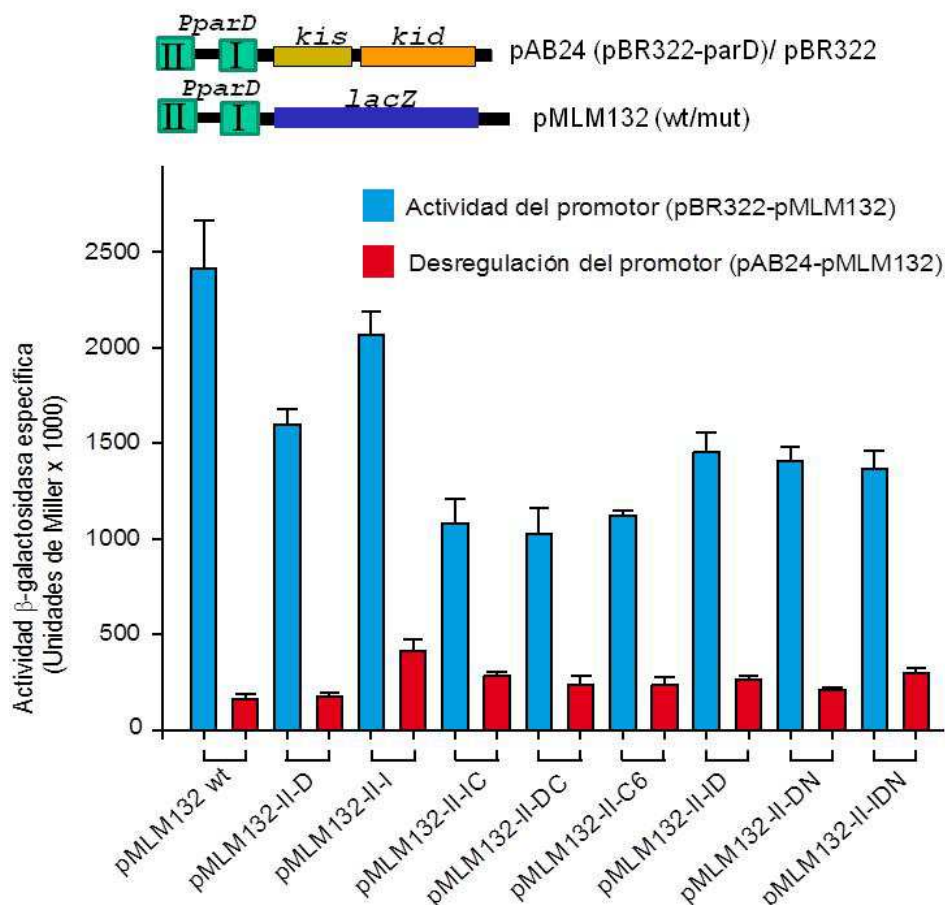


Fig. 28.- Regulación del sistema *parD* en mutantes en la región II analizada mediante ensayo de actividad β -galactosidasa. Barras en azul muestran la actividad del promotor *parD* medido en unidades de Miller. Barras en rojo muestra la desregulación transcripcional del sistema *parD* tanto en el promotor con secuencia silvestre como en distintos mutantes de la región II del promotor de *parD*. Barras en azul muestran el efecto del promotor-operador, silvestre y con mutaciones, sin represor.

Un resumen de estos resultados se muestra en la figura 29, donde podemos ver la actividad del promotor en porcentaje y relativizado a la situación silvestre (pMLM132/pBR322), así como las variaciones en la actividad β -galactosidasa debida a las mutaciones introducidas en distintas regiones del promotor *parD* que afectan a la regulación debida a la unión del complejo Kid-Kis (pMLM132/pAB24). Según los resultados, los mutantes que tienen afectada la zona central de la secuencia palindrómica (en la región II) muestran una actividad del promotor entre el 42 y el 46 %, indicando que estas mutaciones son importantes para la funcionalidad de la ARN polimerasa. También se indica el porcentaje de desregulación del promotor, teniendo en cuenta la actividad promotora de cada uno de los mutantes analizados. Si bien todos los mutantes están desregulados, el mutante (pMLM132-II-IC/pAB24) presenta una mayor desregulación (26%), por lo que estas mutaciones afectan en mayor medida a la interacción reguladora del represor.

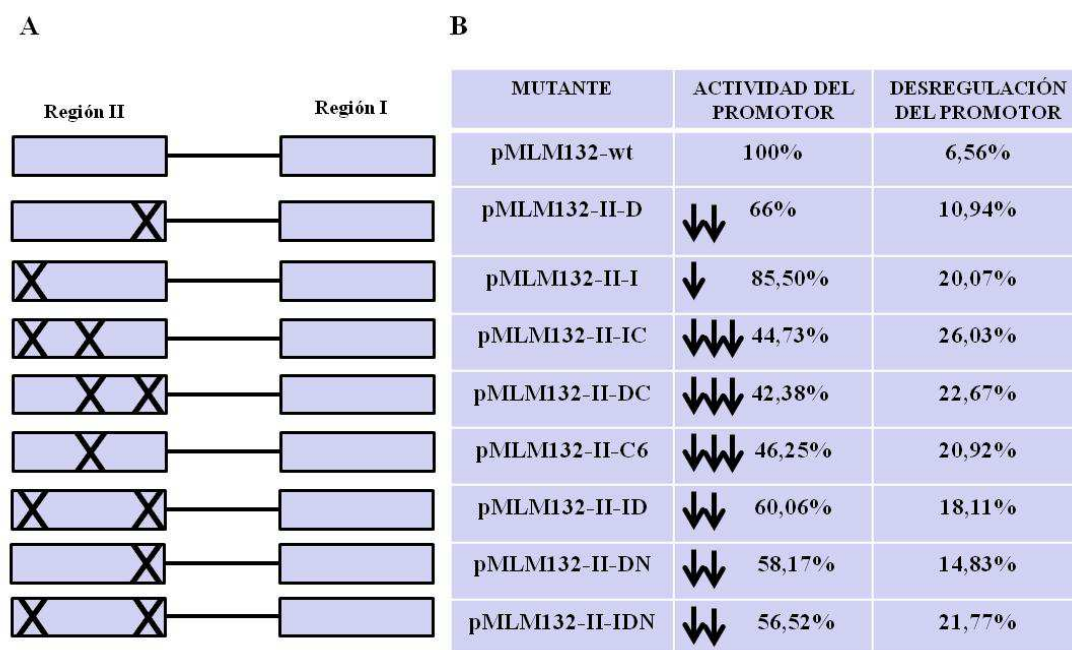


Fig. 29.- Resumen de la actividad del promotor y de la desregulación del sistema *parD* en mutantes en la región II del promotor-operador, procedentes de los ensayos de actividad β -galactosidasa. (A) Esquema mostrando las dos regiones I y II (cajas) que constituyen la región reguladora de *parD*. Se indica (con X) la posición de las mutaciones introducidas en la región II del promotor. **(B)** Tabla en la que se muestran los nombres de los mutantes analizados, la actividad del promotor y la desregulación del sistema en porcentajes y relativizada a su actividad promotora.

R.3.6.2.- Actividad β -galactosidasa de los mutantes en la región I y en los dobles mutantes (regiones I y II mutadas) del promotor-operador *parD*.

Mediante mutagénesis dirigida, se introdujeron cambios de 5 pb en la región I del promotor *parD* en pMLM132. Como en el experimento anterior se determinaron los valores de β -galactosidasa en presencia de pAB24 (pBR322- *parD*) o del plásmido pBR322. También se analizaron mutantes dobles, es decir, mutaciones de 5 bases en la región I combinadas con mutaciones en la región II, previamente descritas, y se determinó en los dos casos la actividad del promotor midiendo los niveles de β -galactosidasa. Los resultados obtenidos en presencia de pBR322 muestran que el mutante en la región I no tiene afectada la actividad del promotor *parD* (figura 30, pMLM132-II-wt-I, barra azul). El recombinante pAB24 que aporta en *trans* el complejo represor Kid-Kis disminuye parcialmente estos niveles. La relación entre ambos valores indica que la mutación interfiere con la represión mediada por las proteínas Kid-Kis (pMLM132-II-wt-I de la figura 30, barra roja). En cuanto a los mutantes dobles analizados, (figura 30, pMLM132-II-IC-I, II-C6-I, II-DC-I, II-IDC-I) todos ellos presentan la actividad promotora afectada aproximadamente al 50 % pero sin embargo las proteínas Kid y Kis proporcionadas por el recombinante pAB24 no regulan el sistema. Las dobles mutaciones (mutantes en región I y II) desregulan completamente el sistema. Esto indica que el operador del sistema está formado por dos regiones separadas, las regiones I y II.

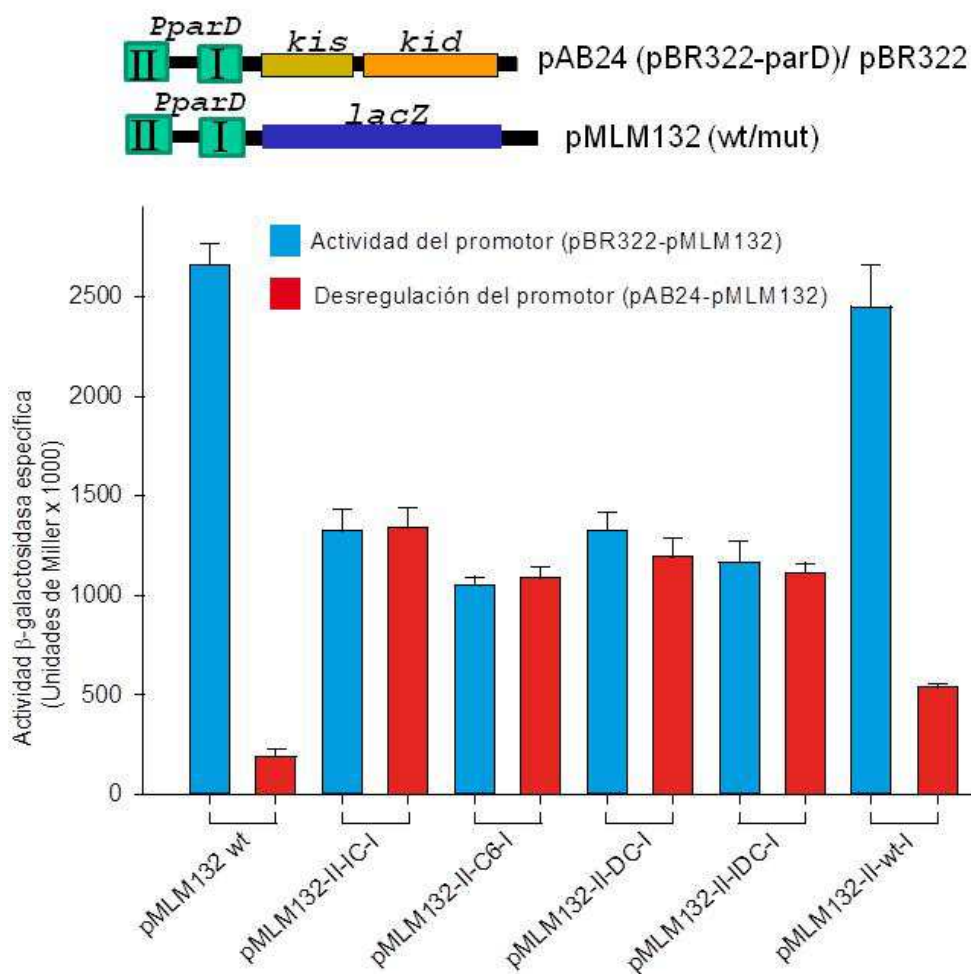


Fig. 30.- Regulación del sistema *parD* en mutantes en la región I/II y I analizada mediante ensayos de actividad β -galactosidasa. Barras en azul muestran la actividad del promotor *parD* medido en unidades de Miller. Barras en rojo muestra la desregulación transcripcional del sistema *parD* tanto en el promotor con secuencia silvestre como en distintos mutantes (región I y I-II) del promotor de *parD*. Barras en azul muestran el efecto del promotor-operador, silvestre y con mutaciones, sin represor.

A modo de resumen, se muestra la figura-tabla de los mutantes analizados *in vivo*. El mutante en la región I no parece tener afectada la actividad promotora, sin embargo está desregulado aproximadamente un 21% con respecto al 6.56% de desregulación que muestra el promotor con secuencia silvestre. Los mutantes dobles que han sido analizados, como hemos dicho anteriormente muestran una actividad promotora afectada entre el 40-50% sin embargo, las proteínas Kid-Kis aportadas en *trans* no reducen este valor de referencia, indicando que los sitios I y II son suficientes para una regulación completa del sistema (figura 31).

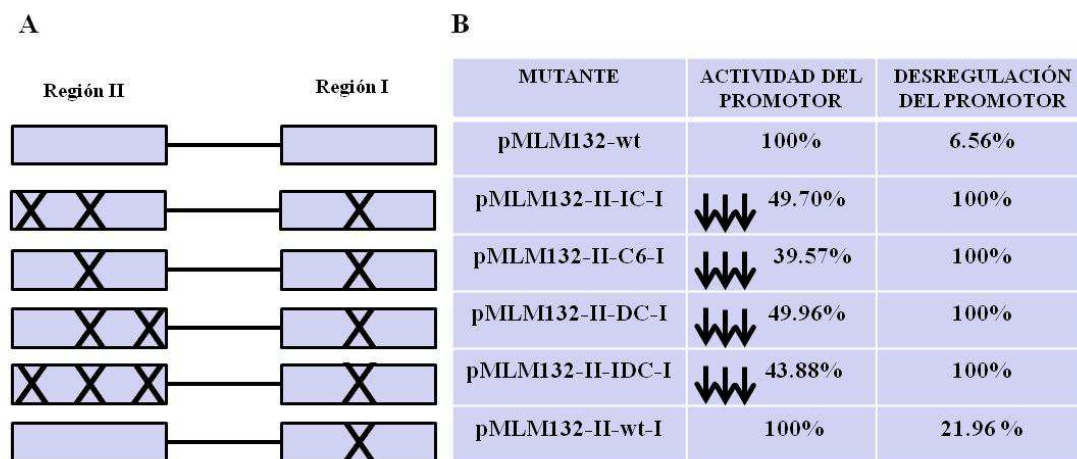


Fig. 31.- Resumen de la actividad del promotor y de la desregulación del sistema *parD* en mutantes en la región II y/o I del promotor-operador procedentes de los ensayos de actividad β -galactosidasa. (A) Se indican (con X) las zonas afectadas en la región I y/o II del promotor. (B) Tabla en la que se muestran los nombres de los mutantes analizados, la actividad del promotor y la desregulación del sistema en porcentajes y relativizada a su actividad promotora.

R.3.6.3.- Resumen.

1.- Cada uno de los sitios I o II por separado contribuye de manera significativa pero limitada a la regulación transcripcional del sistema. La contribución de cada uno de estos sitios parece ser similar a pesar de que el represor interacciona más eficientemente con el sitio I que con el sitio II.

2.- Las mutaciones en I y II desregulan completamente el sistema indicando que estos sitios son suficientes para una regulación eficiente del sistema. Este dato también indica que las mutaciones inactivan la función de cada uno de los sitios y que el operador del sistema está formado por estos dos sitios separados.

3.- Los resultados son compatibles con los datos de EMN que indican que dos heterooctámeros Kis-Kid interaccionando respectivamente en los sitios I y II son los que regulan transcripcionalmente el sistema.

D.- DISCUSSION.

D.- DISCUSION.

D.1.- Secuenciación de pKN1562.

En el capítulo 1 se presenta la secuencia del minireplicón de R1, pKN1562, un plásmido que ha sido clave en los estudios sobre los módulos de mantenimiento que se analizan en esta tesis. El Anexo 1 recoge, en detalle, la secuencia obtenida con indicación de los ORF y otros elementos genéticos identificados. Se muestra una representación gráfica simplificada en la Figura 8. Se disponía de información parcial de la secuencia del replicón básico de R1 y de la región del sistema de estabilidad *parD* y también se disponía de información subrogada de la secuencia del replicón R100 (NC_002134.1) del mismo grupo de incompatibilidad (*incFII*). Esta información subrogada se ha substituido ahora por la secuencia de R1 correspondiente a pKN1562 (ver anexo 1). La secuencia ha sido obtenida inicialmente sobre una de las dos cadenas y se ha verificado, independientemente, utilizando muestras de ADN obtenidas a partir de colonia o de cultivos líquidos respectivamente; además la secuencia obtenida se ha confirmado mediante secuenciación de la cadena complementaria.

La comparación de la secuencia de pKN1562 con la de R100 indica que hay variaciones puntuales que parecen restringidas a una zona amplia (anexo 1; 22pb-1628pb: *repA*, *Ori*, *repA4*) que incluye el replicón básico de estos plásmidos. En el caso del controlador CopB y de su diana, el promotor del gen *repA*, estas variaciones puntuales han dado lugar a diferencias funcionales: CopB no es intercambiable entre los dos replicones. Sin embargo, si lo es el controlador principal de la replicación y determinante de incompatibilidad, el ARN antisentido CopA, ya que ambos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad. También es interesante resaltar que las secuencias de los genes y regiones reguladoras de los sistemas toxina-antitoxina de tipo II de ambos plásmidos, denominados respectivamente en R1 y R100 *parD* y *pem*, son perfectamente idénticas y que los dos sistema ocupan la misma posición relativa en sus genomas. Estos datos sugieren que *parD* y *pem* tienen un origen común y que se han integrado recientemente en un sitio preferente que es el mismo en los dos replicones (Gerdes y col., 2005).

D.2.- Acoplamiento modular entre el sistema *parD* y el módulo de replicación de R1.

D.2.1.- Relación entre la eficiencia de replicación del plásmido R1 y la actividad del sistema *parD*.

Esta tesis estudia aspectos relevantes de la regulación del sistema toxina-antitoxina *parD* encontrado en R1 con un doble foco: reevaluar el acoplamiento entre este sistema y el módulo de replicación del plásmido (capítulo D.2) y caracterizar la naturaleza e interacciones del represor en la región promotora-operadora del sistema *parD* (capítulo D.3).

Como se ha indicado en la introducción, la presencia del sistema *parD* *wt* interfiere con el aislamiento de mutantes condicionales de replicación de pKN1562 (fenotipo que ha sido definido como interferencia replicativa). Estudios previos con una mutación que reduce los niveles de RepA a nivel postraducciona, sin cambiar la secuencia de la proteína, indicaron que la interferencia replicativa respondía a la bajada en el número de copias del plásmido (dosis génica) más que a cambios específicos en la proteína. El análisis indicaba que este acoplamiento estaba asociado a una desrepresión del sistema *parD* y, sorprendentemente, también a una recuperación parcial de la eficiencia de replicación (Ruiz-Echevarria y col., 1995b). Las bases moleculares de este rescate se han sido determinadas: Kid, la toxina del sistema *parD*, es una RNasa independiente de ribosomas (Muñoz-Gomez y col., 2004); (Zhang y col., 2004) y es capaz de procesar el mRNA del controlador negativo del número de copias CopB y aumentar los niveles de RepA y la eficiencia de replicación. (Pimentel y col., 2005). La conclusión es que la toxina Kid actúa como un regulador fino de los niveles/ y de la actividad de CopB en respuesta a una caída en la eficiencia de replicación del plásmido,

En esta tesis hemos revisitado esta conexión entre módulos de mantenimiento con el fin de encontrar el factor que los conecta. En particular se ha explorado si el acoplamiento ocurría desde el modulo de replicación o desde el sistema toxina-antitoxina. Para ello, se ha analizado una colección representativa de mutantes condicionales de replicación del plásmido y también se ha analizado la respuesta del acoplamiento a los niveles de la antitoxina Kis. El análisis incluye una cuantificación del fenotipo de interferencia y también un análisis más detallado del acoplamiento mediante la determinación del número de copias, niveles transcripcionales del sistema *parD* y del rescate de la replicación por el sistema *parD*-*wt* en los mutantes de replicación. Los datos sugieren que una disminución en la eficiencia de replicación desregula el sistema *parD* debido a una disminución en los niveles de la antitoxina. Consistentemente con esta propuesta, un aumento ectópico de los niveles de la antitoxina o un aumento de su estabilidad anulan la conexión entre módulos neutraliza el fenotipo de interferencia replicativa, una huella del acoplamiento entre los dos módulos; el resultado obtenido es muy significativo pero sus consecuencias están todavía pendiente de analizar en profundidad. Esta observación identifica a la antitoxina del sistema *kis-kid* como el interruptor que conecta o desconecta los dos módulos en respuesta a cambios en la dosis génica del sistema: la señal de acoplamiento es la caída en la dosis génica que activa el sistema *parD* a través de la disminución en los niveles de la antitoxina. En resumen, la señal para el acoplamiento llega desde el módulo de replicación pero el acoplamiento está dirigido por la antitoxina y en consecuencia desde el modulo toxina-antitoxina (ver figura 32).

D.2.2.- La ruta de activación del acoplamiento.

Los datos anteriores indican una correlación entre la disminución en el número de copias y una disminución en los niveles de antitoxina Kis; como consecuencia, el sistema *parD* se desregula la toxina Kid se activa parcialmente disminuyendo los niveles del ARN mensajero de CopB. A su vez esta disminución se incrementan los niveles transcripcionales de RepA y como consecuencia se recupera en parte la eficiencia de la replicación del plásmido. Una interrupción de esta vía en un punto determinado podría afectar a los estados posteriores pero no a los anteriores, actuado de

un modo similar al fallo en un determinado punto de una cadena de montaje. De hecho, la activación del sistema *parD* por una replicación plasmídica ineficiente puede ser neutralizada por un incremento en la eficiencia de replicación del plásmido y ello conlleva a una reducción de los niveles transcripcionales de *parD* (Ruiz-Echevarria y col., 1995b). Demostramos que la inactivación de la toxina Kid por la mutación *Kid-D75E* elimina el fenotipo de interferencia pero no impide la desregulación del sistema *parD* en respuesta a una replicación ineficiente del plásmido R1. Puesto que el efecto último del acoplamiento se modula sobre los niveles de CopB, es predecible que un incremento ectópico en los niveles intracelulares de CopB neutralice el fenotipo de interferencia (relación próxima a 1 de Repts/AphA1ts) sin interferir con la desregulación del sistema *parD* o con la activación de la toxina Kid. La validación del modelo requiere, en primer lugar, determinar si los niveles de la antitoxina decaen en los mutantes condicionales de replicación. Esta evaluación no ha podido hacerse hasta la fecha debido a que los anticuerpos anti-Kis disponibles no tienen la sensibilidad requerida. Otra vía de evaluación pendiente de verificar sería estudiar mediante qPCR si una elevación ectópica de los niveles de la antitoxina o un fondo genético $\Delta lon/clpP$, donde los niveles de la antitoxina se mantienen estables, anula el rescate de replicación y la desregulación del sistema observada en el fondo *parD*-wt en el mutante *RepAR55H* (sección R.2.5, figura 13).

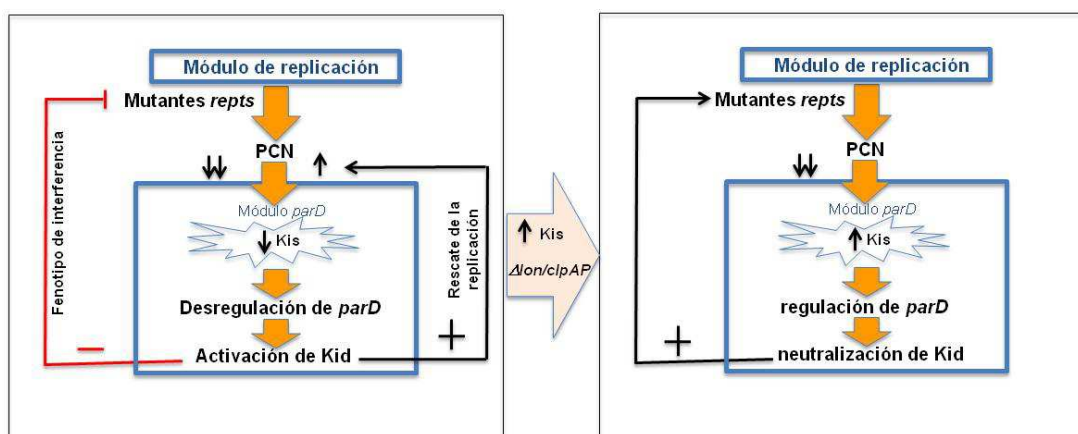


Fig. 32.- Esquema resumen de la conexión entre el módulo de replicación y el sistema *parD*. Mutantes *repts* bajan el número de copias del plásmido y disminuyen los niveles de la antitoxina Kis. Esta disminución produce una desregulación del sistema *parD* con la consiguiente activación de la toxina Kid. La activación de Kid, por un lado, rescata la eficiencia de replicación (aumento en el PCN), y por otro interfiere con el aislamiento de mutantes condicionales de replicación (fenotipo de interferencia). La neutralización del fenotipo de interferencia observado cuando se sobre-expresa la antitoxina en *trans* o se aumenta su estabilidad utilizando como huésped un doble mutante en las proteasas Lon y ClpP, predice que los niveles transcripcionales del sistema volverán a la situación regulada y se anulará el rescate replicativo debido a la neutralización de la toxina Kid.

D.2.3.- Papel del acoplamiento entre replicación y el sistema *parD*.

¿Cuál podría ser el papel de este acoplamiento modular en la célula? Se ha señalado su papel auxiliar en la recuperación de la eficiencia de replicación del plásmido. Debido a

que la toxina Kid modula el rescate de la replicación mediada por CopB, el acoplamiento descrito aquí podría, al igual que CopB, jugar un papel en el rescate de la replicación durante los primeras etapas en el establecimiento de estos elementos genéticos en un nuevo huésped o durante la propagación plasmídica en huéspedes en los que la eficiencia de replicación del plásmido pudiera estar limitada. Hay que tener en cuenta, que la activación parcial de la toxina dentro de la célula, asociada al acoplamiento modular, también podría contribuir a la estabilización del plásmido mediante la inhibición de la proliferación en células segregantes libres de plásmidos (Ruiz-Echevarria y col., 1995b).

Otra posible función o consecuencia del acoplamiento podría ser la limitación de la integración del replicón R1 en el cromosoma. pKN1562 se puede integrar y substituir a la región de el *oriC* del cromosoma *E. coli* (Koppes and Nordstrom, 1986). Hemos determinado que en esta estirpe el sistema *parD* está desregulado (figura 33) lo que abre la posibilidad de que la toxina esté activada y contribuya a la eficiencia de replicación requerida para la integración supresora. Un análisis detallado de la replicación cromosómica en esta estirpe en presencia de un exceso de la antitoxina Kis podría añadir información sobre este punto. Por otra parte, queda abierta la posibilidad de que la activación del sistema que sigue a la integración, introduzca restricciones para la integración en posiciones del genoma más próximas al término de replicación donde la dosis génica relativa sea menor que la región del origen. El análisis comparado de las posiciones de integración de un sistema *parD*-wt o mutado (*KidD75E*) al cromosoma podría también esclarecer este punto y determinar si este sistema podría limitar el tráfico del plásmido R1 entre una situación autónoma y otra integrada.

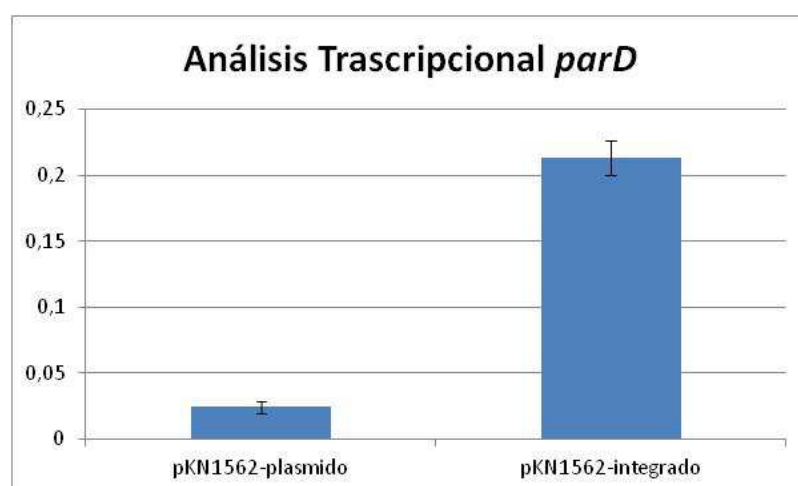


Fig. 33.- Análisis transcripcional del sistema *parD* en pKN1562 libre e integrado en el cromosoma bacteriano. Se muestra por triplicado los niveles transcripcionales del plásmido pKN1562 libre o integrado en el cromosoma.

D.2.4.- Las mutaciones *repts* de pKN1562.

D.2.4.1.- Identificación de funciones afectadas.

La extensa colección de mutantes condicionales de replicación aislados en el estudio del acoplamiento abre una vía para el análisis genético-funcional del inicio de la replicación del plásmido R1 y más en particular de las interacciones de la proteína iniciadora RepA en el origen de replicación.

En ausencia de fenotipo de interferencia, las mutaciones aisladas en *repA* se extienden a todo el gen, una localización que es consistente con la existencia de múltiples regiones funcionales en la proteína propuestas por el modelo disponible sobre iniciación de la replicación del plásmido ((Giraldo y Diaz, 1992), Figura 34 panel A): Según este modelo dos dímeros de la proteína RepA se unen específicamente y secuencialmente a dos regiones palindrómicas distales en el origen de replicación (*OriR1*) formando un bucle. Este bucle se llena, posteriormente, con más moléculas de proteína RepA que entraría en el *oriR1* por interacciones proteína-proteína (RepA-RepA) (ver Figura). El complejo multiprotéico RepA-*oriR1* resultante guiaría la incorporación de la proteína iniciadora DnaA en la caja *dnaA* presente en *oriR1* (Ortega y col., 1986). Así, el modelo sugiere la existencia de al menos cuatro regiones funcionales en la proteína RepA que podrían ser diana de los mutantes termosensibles aislados durante este trabajo: i) una interfase de dimerización, ii) una región de unión al ADN, iii) una región involucrada en las interacciones RepA-RepA necesaria para llenar el bucle *oriR1* y iv) una región que participa en las interacciones con los factores de replicación del huésped (posiblemente DnaA). Dependiendo del cambio introducido en la región afectada, las mutaciones podrían tener mayor o menor efecto en la replicación del plásmido (figura 34).

Es importante destacar que, aunque la mayoría de las mutaciones de replicación aisladas se localizan en el gen de la proteína RepA, durante este trabajo también se ha aislado una transición CG-TA en la primera base del sitio de alta afinidad en *oriR1* (5'-CATTTAACTG-3') para RepA (Giraldo y Diaz, 1992). Esta mutación también disminuye el número de copias del plásmido y desregula el sistema *parD* a la temperatura permisiva (Resultados R.2.3, figura 12 paneles C y D). Además también se ha aislado una mutación *repts* en el gen de la proteína acopladora Tap. Estas dos mutaciones aisladas fuera de la proteína RepA indican que esta proteína no está implicada de un modo directo en el acoplamiento. La desregulación del sistema *parD* en el plasmido pKN1562 integrado es consistente con esta propuesta (figura 36). Tap es el péptido adaptador necesario para la síntesis de RepA. La regulación de la síntesis de RepA por CopA es debida a una inhibición directa de la síntesis de Tap (Blomberg y col., 1992). *oriR1* y *tap* son también elementos clave requeridos para la iniciación de la replicación del plásmido R1 y, por lo tanto, posibles dianas de las mutaciones *repts*. Puesto que la secuencia de aminoácidos no es relevante para la función de la proteína acopladora Tap y, además, la mutación aislada no induce cambio en el aminoácido correspondiente, es posible, que como en otras mutaciones previamente identificadas, el efecto esté mediado por un cambio en la estructura del mRNA que afecte al acoplamiento entre la síntesis de las proteínas Tap y RepA (Berzal-Herranz y col., 1991).

D.2.4.2.- Localización de las mutaciones en RepA sobre un modelo estructural de la proteína.

En colaboración con este trabajo, el Dr. Rafael Giraldo ha modelado el dímero de la proteína RepA de R1 basándose en las estructuras de los dímeros de las proteínas iniciadoras de pPS10 y del plásmido F (figura 34, panel B y figura 35). Las secuencias de estas proteínas Rep se alinearon conforme a como se describe en (Giraldo y col., 2003); (Nakamura y col., 2007). Dicho alineamiento se empleó como referencia sobre la que ajustar la secuencia de la proteína RepA del plásmido R1, utilizando el programa Clustal-X (Thompson y col., 1997). Para ambas proteínas molde, la estructura tridimensional de sus dímeros es conocida (PDB: 1HKQ y 2Z9O, respectivamente), lo que permitió que el alineamiento de RepA del R1 fuese corregido localmente de forma manual, respetando la integridad de los elementos de estructura secundaria. El alineamiento corregido fue empleado como referencia para el modelado *en línea* de RepA de R1 en el servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>; (Arnold y col., 2006). La estereoquímica del modelo generado para el dímero de RepA (R1) fue verificada mediante inspección de los diagramas de Ramachandran para cada una de sus dos cadenas (Procheck: <http://deposit.rcsb.org/validate>). El modelo resultante (Figura 35) sugiere la presencia de una interfase de dimerización formada por dos horquillas β (marcada como 1 en la figura 35) y de otra horquilla- β en el dominio C-terminal WH2 de RepA de R1 (marcada 4 en la figura) que genera una superficie de oligomerización a través de láminas- β antiparalelas, análoga a la implicada en la dimerización.

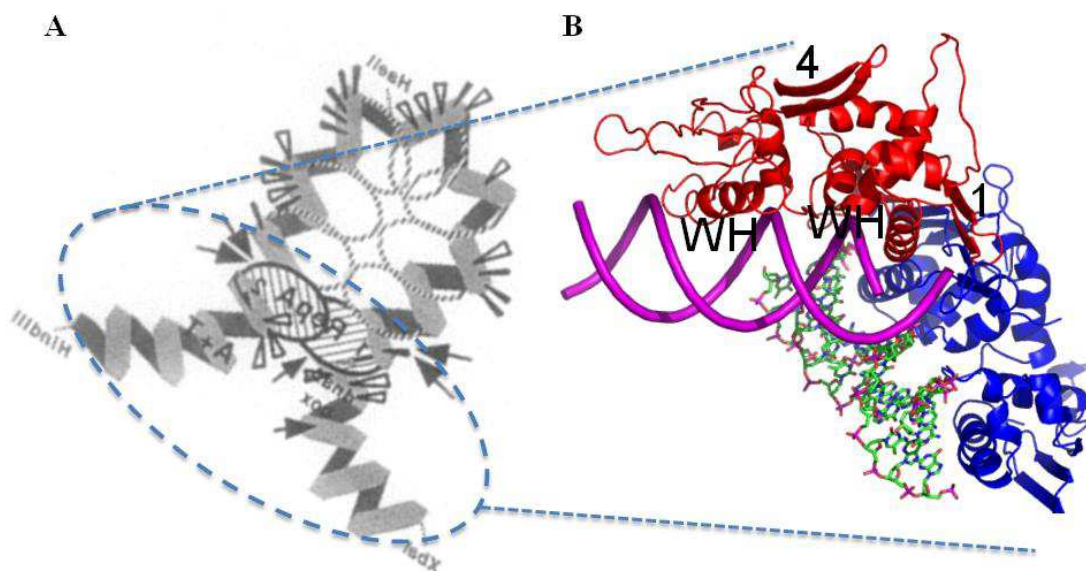


Fig. 34.- Modelo de interacción de un dímero de RepA con el origen de replicación *oriR1*. (A) Modelo disponible de la interacción de la proteína RepA en *oriR1* al comienzo de este trabajo (Giraldo y Diaz, 1992). (B) Modelo disponible actualmente del dímero de la proteína RepA de R1 interaccionando en *oriR1*, zona de interacción RepA-ADN modelada. Según este modelo cada monómero del dímero es un pseudo-dímero que contiene dos regiones de unión al DNA (WH). Los monómeros contienen dos regiones potenciales de interacción RepA-RepA marcadas como 1 y 4 en la figura. La región 1 permitiría la dimerización de la proteína y la región 4 participaría en las interacciones entre proteínas RepA que rellenarían el bucle según se indica en el panel A. (ver figura 35).

La estructura del dímero de RepA es la correspondiente a dos monómeros que contienen un eje de simetría binario cada uno (pseudo-dímeros), y que dimerizan a través de una interfase tipo β -amiloide (región 1). En la estructura modelada de RepA pueden identificarse, además de la región de interacción proteína-proteína marcadas como 1 y 4, dos regiones de interacción con el ADN (motivos WH1 y WH2) en cada monómero y un lazo (marcado como 3 en la figura 35) que podría corresponder a la región de interacción de RepA con factores de replicación del huésped (posiblemente con la proteína DnaA). Las mutaciones *repA*s aisladas en ausencia de una toxina funcional, pJLV01 (*parD-D75E*), se localizan en estas cuatro regiones (Figura 35). Las pocas mutaciones *repA*s aisladas en pKN1562 con un sistema *parD* silvestre se localizan en el lazo que podría participar en interacciones con factores de replicación del huésped y en la putativa interfase de multimerización RepA-RepA (figura 35, región 3 y 4). No se han aislado en este plásmido mutaciones en residuos de los motivos WH1 y WH2 de interacción con *oriR1*. Es posible que en presencia de un sistema *parD* silvestre las interacciones compensadoras de residuos no mutados en estas regiones atenúen el efecto de las mutaciones sencillas aisladas y ello favorezca su aislamiento en este contexto más restrictivo.

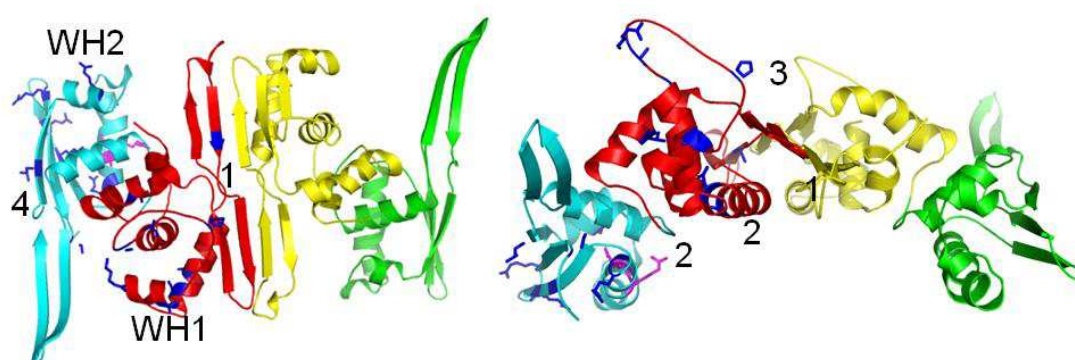


Fig. 35.- Modelo estructural de las regiones funcionales identificadas en la proteína RepA en dos orientaciones. (1) Regiones de la proteína RepA implicadas en dimerización. (2) Regiones implicadas en la interacción con *oriR1* (motivos WH). (3) Posibles regiones de interacción con factores del huésped (posiblemente DnaA). (4) β -láminas antiparalelas implicadas en interacciones proteína-proteína. En azul oscuro se muestran los residuos en los que se han aislado mutantes termosensibles de replicación.

Es muy interesante que la proteína RepA del plásmido R1 comparta similitudes estructurales importantes con las proteínas iniciadoras RepA y RepE de los plásmidos pPS10 y F a pesar de que R1 difiere drásticamente en cuanto a las interacciones que inician el proceso replicativo y que lo controlan. En los plásmidos pPS10 y F el control de replicación está modulado por interacciones que unen dos replicones a través de interacciones entre las proteínas iniciadoras unidas a las secuencias repetidas del origen de replicación. Estos complejos que se denominan “hand-cuffing” no permiten el inicio del proceso replicativo. Los complejos de “hand-cuffing” pueden desensamblarse y permitir que los monómeros de las proteínas iniciadoras unidas a las secuencias repetidas del origen de replicación inicien el proceso. Por otra parte, estas proteínas iniciadoras están organizadas en dos módulos y pueden ensamblarse y formar dímeros en un

proceso en el que el dominio amino terminal de la proteína sufre un cambio conformacional que expone la interfase de dimerización; las dos regiones carboxilo terminales del dímero no sufren cambios conformacionales y contienen un dominio HTH que permite la interacción específica con sus promotores y la regulación transcripcional de la síntesis de la proteína (Giraldo y Fernandez-Tresguerres, 2004). A diferencia de RepA y RepE de pPS10 y F, RepA de R1 interacciona como dímero con las secuencias del origen de replicación promoviendo el inicio del proceso. También el control de replicación es diferente en este plásmido: está modulado independientemente por dos reguladores que actúan respectivamente reprimiendo la síntesis de la proteína iniciadora (CopB, el controlador auxiliar), e inhibiendo la síntesis de un acoplador necesario para la síntesis de la proteína RepA (CopA, el controlador principal). Finalmente son los niveles de la proteína RepA los que determinan la frecuencia de inicio de replicación y en consecuencia el número de copias del plásmido. Es notable también que el módulo común de las proteínas iniciadoras de estos plásmidos bacterianos se encuentre conservado en proteínas iniciadoras de replicación de arqueas y eucariotas lo que sugiere que todas ellas derivan de un ancestro común (Giraldo y Diaz-Orejas, 2001); (Giraldo, 2003).

D.3.- Regulación transcripcional del sistema *parD*.

Se ha reportado previamente que una regulación eficiente del operón *parD in vivo* requiere la acción conjunta de las proteínas Kid y Kis (Ruiz-Echevarria y col., 1991). Estudios *in vitro* han demostrado que Kid y Kis pueden formar múltiples complejos con diferentes estequiometrias y estados oligoméricos, dependiendo de la relación molar entre Kid y Kis (Kamphuis y col., 2007). El hetero-hexámero Kid₂-Kis₂-Kid₂ es la especie más abundante cuando la concentración molar de Kid excede a Kis, mientras que varios complejos Kid-Kis, entre ellos un hetero-octámero Kid₂-Kis₂-Kid₂-Kis₂, están presentes cuando la concentración de Kis es equimolar o está en exceso de la concentración de toxina Kid.

Los estudios de interacción de los complejos Kid-Kis con el ADN y los datos de espectrometría de masas obtenidos muestran que la antitoxina Kis interacciona específicamente con el PO-*parD* pero lo hace con baja afinidad. Esos datos son consistentes con los estudios previos *in vivo*, en los cuales se había mostrado que Kis sola era un represor débil del sistema (Ruiz-Echevarria y col., 1991). La adición de la toxina Kid a la antitoxina Kis incrementa la afinidad de unión de esta proteína por el PO-*parD*, sin embargo, la estabilidad de los complejos proteína-ADN viene determinada por la relación molar entre Kid y Kis. El análisis presentado indica que cuando Kid y Kis están en una relación molar 2:1 (es decir, en exceso de toxina), se forma un hetero-hexámero que interacciona débilmente con el PO-*parD*. Por lo tanto, en estas condiciones, el sistema está prácticamente desregulado. Por el contrario, a una relación equimolar de Kid y Kis y en presencia del PO-*parD*, la única especie unida al ADN es un hetero-octámero Kid₂-Kis₂-Kid₂-Kis₂. Ello indica que la interacción eficiente de este hetero-octámero con el ADN desplaza el equilibrio entre las distintas especies moleculares observadas en ausencia de ADN hacia esta forma que se propone como la especie reguladora. Por otra parte, el hetero-hexámero formado en exceso de la toxina se une con baja afinidad al ADN. En este complejo el potencial de la antitoxina para neutralizar la toxina está optimizado: un dímero de antitoxina neutraliza dos dímeros de toxina. También se observó que las dos situaciones finales podía revertirse

cuando se invertía la relación toxina-antitoxina. Estos datos sugerían que la represión transcripcional depende críticamente de la relación molar entre Kid y Kis.

El juego reversible, entre hetero-hexámero y hetero-octámero, que es dependiente de la dosis relativa de la toxina y la antitoxina, funcionaría como un oscilador que balancea el sistema *parD* hacia la situación regulada y evita así efectos no deseados de un exceso de toxina (figura 36). Este patrón de regulación en el que la antitoxina pilota la interacción con el ADN y la toxina juega un papel potenciador cuando no está en exceso y un papel inhibidor de la interacción cuando está en exceso de la antitoxina, se denomina cooperatividad condicional. Este mecanismo de regulación fue descrito por primera vez en el plásmido *ccd* (Afif y col., 2001); (Madl y col., 2006) y seguidamente, en el sistema *parD* (*in vitro*) y en otros sistemas toxina-antitoxina tipo II tales como el sistema *phd-doc* (Magnuson y Yarmolinsky, 1998) y RelBE (Overgaard y col., 2008).

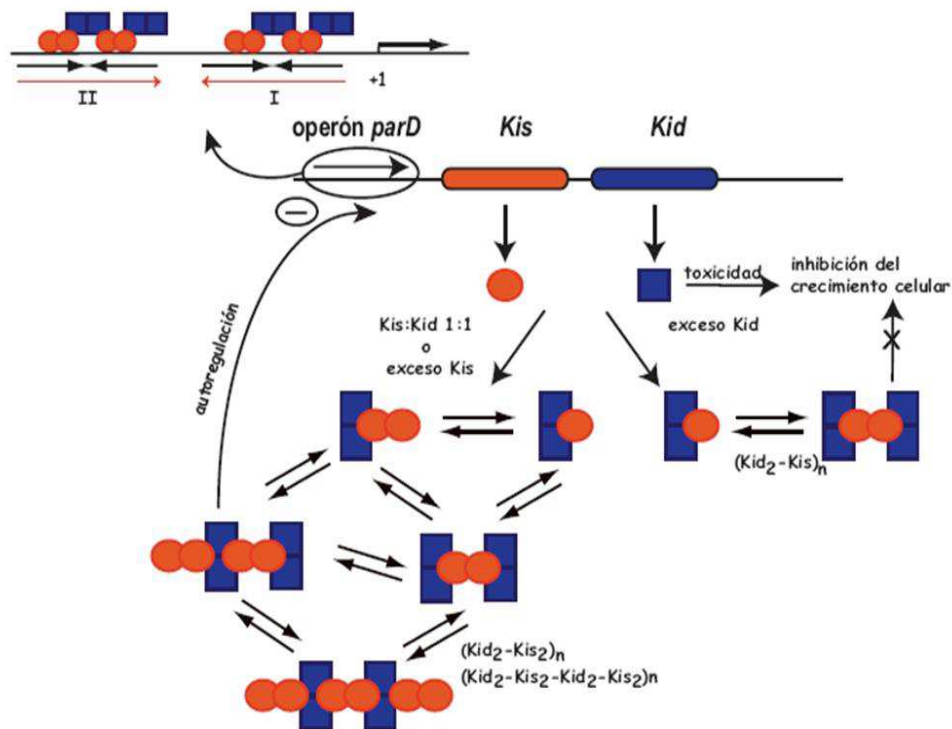


Fig. 36.- Modelo esquemático de la autorregulación transcripcional del operón *parD*. El gen *kid* y la proteína Kid se muestran en azul y el gen *kis* y la proteína Kis en rojo. Cada complejo Kid-Kis está representado por una combinación apropiada de rectángulos azules (Kid) y de elipses rojas (Kis). La toxina Kid que no está unida a la antitoxina Kis, ejerce su actividad RNasa inhibiendo el crecimiento celular. En condiciones en las que la concentración de Kid es mayor que la de Kis se forman los complejos Kid₂-Kis y Kid₂-Kis₂-Kid₂. En estos complejos, la actividad toxica de Kid está neutralizada.. Cuando la concentración de Kid es igual o más baja que la de Kis se forman varios complejos con capacidad neutralizadora y reguladora. En presencia de las secuencias PO-*parD* el equilibrio entre las formas se desplaza para originar complejos Kis-Kid hetero-octaméricos que se unen al ADN en las regiones I y II.

La estrecha interacción con la región I de *parD* y la formación de dos hetero-octámeros unidos posiblemente a las regiones I y II, así como los ensayos de transcripción *in vivo* con los mutantes en el *PO-parD*, tanto en la región I como en la II, indican que para que exista una represión eficaz del sistema se requieren interacciones del represor en ambas regiones operadoras. En efecto: las mutaciones que impiden la interacción del hetero-octámero en uno de los sitios, ya sea en el sitio I o en el sitio II, permiten una regulación parcial del sistema. Sólo cuando las dos regiones operadoras están afectadas, el sistema está completamente desregulado. En este doble mutante y en exceso de antitoxina no se observan interacciones del hetero-octámero con la región *PO-parD*, y solo se detectan interacciones ineficientes del hetero-hexámero que no son suficientes para regular. Estos resultados también implican que los mutantes analizados (I-I y II-C6) inactivan completamente los sitios I y II, respectivamente. Posibles efectos sinérgicos entre los represores unidos al operador del sistema podrían añadir complejidades adicionales a esta regulación.

El modelo de regulación que se describe, basado en el requerimiento de las dos regiones operadoras I y II, junto con resultados preliminares que indican que el represor del sistema coexiste con la ARN polimerasa en la región *PO-parD* (Santos-Sierra, 2002), supone un punto de partida para un análisis detallado del mecanismo de regulación transcripcional del sistema toxina-antitoxina *parD*, que implica a la ARN polimerasa y a las proteínas del sistema. Este análisis se está realizando actualmente en nuestro laboratorio. Los estudios de regulación transcripcional y los datos anteriores sobre la regulación postranscripcional del sistema (Ruiz-Echevarria y col., 1995a); (Lemonnier y col., 2004), así como los datos del acoplamiento entre la actividad del sistema y la eficiencia de replicación del plásmido, que se ha reevaluado en la primera parte de esta tesis, ponen de manifiesto la gran variedad de mecanismos que coordinan la regulación de este sistema toxina-antitoxina. Finalmente añadir que estudios en curso en nuestro laboratorio indican que, como se ha descrito en otros sistemas T-A (Van Melder y Aertsen, 2009), la regulación de los niveles de la antitoxina Kis debido a la acción de proteasas celulares juega un papel importante en la regulación de este sistema (Diago-Navarro y col. resultados no publicados).

C.- CONCLUSIONES.

C.- CONCLUSIONES.

- 1.- Se ha completado la secuencia del miniplásmid de R1 pKN1562, que contiene los módulos de replicación y toxina-antitoxina *parD* (*kis*, *kid*) que se estudian en este trabajo.
- 2.- Se han obtenido una extensa colección de mutantes condicionales de replicación (*repts*) de pKN1562 y se han localizado principalmente en *repA*, el gen de la proteína iniciadora de replicación RepA. Una mutación *repts* aislada afecta el gen de la proteína acopladora Tap y otra se localiza en *oriR1*, el origen de replicación del plásmido.
- 3.- Los cambios introducidos por las mutaciones en *repA* se han localizado en 4 posibles regiones funcionales de la proteína RepA según predice un modelado de la estructura de esta proteína que se analiza en la discusión.
- 4.- Utilizando distintos mutantes de replicación del plásmido R1 se ha explorado la existencia de un acoplamiento funcional entre el replicón básico y el sistema toxina-antitoxina *parD* de R1. Hay una correlación inversa entre la eficiencia de replicación plasmídica y la activación del sistema *parD*, que se manifiesta como una desregulación del sistema y una activación parcial de Kid, la toxina del sistema, en respuesta a replicación plasmídica ineficiente.
- 5.- El acoplamiento entre los dos módulos de mantenimiento permite una recuperación de la eficiencia de replicación e incrementa a la temperatura permisiva la estabilidad del plásmido en los mutantes condicionales de replicación. Este rescate replicativo es dependiente de la actividad RNasa de la toxina Kid y ocurre más eficientemente por encima de un determinado umbral de replicación.
- 6.- El análisis realizado cuantifica el fenotipo que se ha denominado “de interferencia replicativa” como una disminución próxima al 70% en la frecuencia relativa de aislamiento de mutantes de replicación en presencia de un sistema *parD*-wt. Esta cuantificación nos ha permitido utilizar esta huella del acoplamiento para identificar el sensor que conecta el módulo replicativo y el sistema T-A *parD*.
- 7.- La anulación del fenotipo de de interferencia por un aumento artificial de los niveles de la antitoxina Kis o de su estabilidad, implica que los niveles de esta antitoxina disminuyen en los mutantes de replicación y que esta disminución es el sensor del acoplamiento entre módulos.
- 8.- La antitoxina Kis se une a la región promotora-operadora de *parD* (PO-*parD*) con baja afinidad. La toxina Kid no interacciona con esta región del ADN pero incrementa la afinidad de unión de Kis al PO-*parD* en un orden de magnitud.
- 9.- Las interacciones proteína-ADN ocurren, tanto en presencia como en ausencia de la toxina Kid, en dos regiones discretas del PO denominadas I y II que se sitúan entre las posiciones -72 y + 5 con respecto al sitio de iniciación de la transcripción. La interacción ocurre preferentemente en las ramas de la repetición invertida de 18 pb presente en los sitios I y II. La región espaciadora de 33 bp localizada entre las regiones I y II no está protegida por el complejo Toxina-Antitoxina.

10.- La antitoxina Kis pilota la interacción del complejo Kid-Kis represor con la región operadora.

11.- Los complejos Kis-Kid/PO-parD formados en presencia de competidor aparecen cuando la relación molar entre de Kis/Kid es igual o superior a uno, indicando que las interacciones proteína-ADN más específicas dependen de la dosis relativa de las dos proteínas del sistema y ocurren cuando la toxina no escede a la antitoxina.

12.- La estequiometría entre Kis y Kid es importante para una regulación eficiente: En exceso de la toxina Kid los complejos Kid-Kis formados son hetero-hexámeros que tienen baja afinidad por el ADN; mientras que en exceso de Kis se forman hetero-octámeros que tienen alta afinidad por los sitios I y II del *PO-parD*.

13.- Los datos de espectrometría de masas y los datos de EMSA y de protección, indican que la antitoxina o el complejo heterooctamérico Kis-Kid formado en exceso de la antitoxina, contactan con las dos ramas de la repetición invertida de los sitios I o II. El dímero de la toxina en el heterooctámero represor, une y sitúa en fase a los dos dímeros de antitoxina que contactan en I o II. Ello explica que el heterooctámero tenga mayor afinidad que la antitoxina o que el heterohexámero por estas secuencias.

14.- El análisis por EMN de los complejos toxina-antitoxina de los mutantes afectados en I y o II son consistentes con este modelo: i) mutaciones introducidas en el sitio I o en el sitio II, permiten la interacción de un sólo hetero-octámero, que probablemente se une en el sitio no mutado ii) el doble mutante en los sitios I y II, no permiten la interacción del hetero-octámero; tan sólo permiten una interacción ineficiente del hetero-hexámero en el sitio I o bien en el sitio II incluso cuando la antitoxina está en exceso de la toxina.

15.- Se ha estudiado *in vivo* el efecto de las mutaciones en los sitios I y/o II sobre la actividad del promotor utilizando fusiones transcripcionales de la región PO con el gen indicador *lacZ* y determinando los niveles de β -galactosidasa en presencia o ausencia de niveles silvestres de las proteínas Kis y Kid. El análisis indica que: i) los sitios I o II por contribuyen independiente y de manera significativa y similar pero limitada a la regulación transcripcional del sistema

16.- Los mutantes en los I y II desregulan completamente el sistema, indicando que aunque están separados ambos sitios forman el operador del sistema. El efecto de las dobles mutaciones en I y II es superior a un efecto aditivo de cada una de las mutaciones por separado implicando un efecto cooperativo no explicado todavía en términos moleculares.

17.- Los resultados integrados del análisis de la actividad del promotor parD *in vivo* y de los estudios *in vitro* de las interacciones de las proteínas del sistema con la región promotora-operadora indican que la regulación transcripcional del sistema es debida a las interacciones de dos hetero-octámeros Kis-Kid respectivamente en los sitios I y II presentes en dicha región.

B.- BIBLIOGRAFÍA.

B.- BIBLIOGRAFÍA.

- Afif, H.; N. Allali; M. Couturier y L. Van_Melderen, (2001) The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the ccd poison-antidote system. *Molecular microbiology* 41: 73-82.
- Arnold, K.; L. Bordoli; J. Kopp y T. Schwede, (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)* 22: 195-201.
- Bennett, P. M., (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology* 153 Suppl 1: S347-357.
- Bernander, R.; M. Krabbe y K. Nordstrom, (1992) Mapping of the in vivo start site for leading strand DNA synthesis in plasmid R1. *The EMBO journal* 11: 4481-4487.
- Berzal-Herranz, A.; E. G. Wagner y R. Diaz-Orejas, (1991) Control of replication of plasmid R1: the intergenic region between *copA* and *repA* modulates the level of expression of *repA*. *Molecular microbiology* 5: 97-108.
- Birnboim, H. C. y J. Doly, (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7: 1513-1523.
- Blattner, F. R.; G. Plunkett, 3rd; C. A. Bloch; N. T. Perna; V. Burland; M. Riley; J. Collado-Vides; J. D. Glasner; C. K. Rode; G. F. Mayhew; J. Gregor; N. W. Davis; H. A. Kirkpatrick; M. A. Goeden; D. J. Rose; B. Mau y Y. Shao, (1997) The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science (New York, N.Y)* 277: 1453-1462.
- Blomberg, P.; K. Nordstrom y E. G. Wagner, (1992) Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *The EMBO journal* 11: 2675-2683.
- Blower, T. R.; P. C. Fineran; M. J. Johnson; I. K. Toth; D. P. Humphreys y G. P. Salmond, (2009) Mutagenesis and functional characterization of the RNA and protein components of the toxIN abortive infection and toxin-antitoxin locus of Erwinia. *Journal of bacteriology* 191: 6029-6039.
- Blower, T. R.; X. Y. Pei; F. L. Short; P. C. Fineran; D. P. Humphreys; B. F. Luisi y G. P. Salmond, (2010) A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nature structural & molecular biology* 18: 185-190.
- Blower, T. R.; G. P. Salmond y B. F. Luisi, (2011) Balancing at survival's edge: the structure and adaptive benefits of prokaryotic toxin-antitoxin partners. *Current opinion in structural biology* 21: 109-118.

- Blower, T. R.; F. L. Short; F. Rao; K. Mizuguchi; X. Y. Pei; P. C. Fineran; B. F. Luisi y G. P. Salmond, (2012) Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic acids research* 40: 6158-6173.
- Bolivar, F.; R. L. Rodriguez; P. J. Greene; M. C. Betlach; H. L. Heyneker y H. W. Boyer, (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.
- Bramhill, D. y A. Kornberg, (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54: 915-918.
- Bravo, A.; G. de Torrontegui y R. Diaz, (1987) Identification of components of a new stability system of plasmid R1, *parD*, that is close to the origin of replication of this plasmid. *Mol Gen Genet* 210: 101-110.
- Bravo, A.; S. Ortega; G. de Torrontegui y R. Diaz, (1988) Killing of *Escherichia coli* cells modulated by components of the stability system *parD* of plasmid R1. *Mol Gen Genet* 215: 146-151.
- Buts, L.; J. Lah; M. H. Dao-Thi; L. Wyns y R. Loris, (2005) Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends in biochemical sciences* 30: 672-679.
- Casadaban, M. J. y S. N. Cohen, (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 138: 179-207.
- Datta, N. y P. Kontomichalou, (1965) Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* 208: 239-241.
- del Solar, G.; R. Giraldo; M. J. Ruiz-Echevarria; M. Espinosa y R. Diaz-Orejas, (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 434-464.
- Diago-Navarro, E.; A. M. Hernandez-Arriaga; J. Lopez-Villarejo; A. J. Munoz-Gomez; M. B. Kamphuis; R. Boelens; M. Lemonnier y R. Diaz-Orejas, (2010) *parD* toxin-antitoxin system of plasmid R1--basic contributions, biotechnological applications and relationships with closely-related toxin-antitoxin systems. *The FEBS journal* 277: 3097-3117.
- Diago-Navarro, E.; M. B. Kamphuis; R. Boelens; A. Barendregt; A. J. Heck; R. H. van den Heuvel y R. Diaz-Orejas, (2009) A mutagenic analysis of the RNase mechanism of the bacterial Kid toxin by mass spectrometry. *The FEBS journal* 276: 4973-4986.
- Diaz, R.; K. Nordstrom y W. L. Staudenbauer, (1981) Plasmid R1 DNA replication dependent on protein synthesis in cell-free extracts of *E. coli*. *Nature* 289: 326-328.

- Diaz, R. y S. Ortega, (1984) Initiation of plasmid R1 replication in vitro is independent of transcription by host RNA polymerase. *Nucleic acids research* 12: 5175-5191.
- Diaz, R. y W. L. Staudenbauer, (1982) Replication of the broad host range plasmid RSF1010 in cell-free extracts of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic acids research* 10: 4687-4702.
- Donachie, W. D.; K. J. Begg y M. Vicente, (1976) Cell length, cell growth and cell division. *Nature* 264: 328-333.
- Dower, W. J.; J. F. Miller y C. W. Ragsdale, (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids research* 16: 6127-6145.
- Field, C. M. y D. K. Summers, (2012) Indole inhibition of ColE1 replication contributes to stable plasmid maintenance. *Plasmid* 67: 88-94.
- Fineran, P. C.; T. R. Blower; I. J. Foulds; D. P. Humphreys; K. S. Lilley y G. P. Salmond, (2009) The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 894-899.
- Fozo, E. M.; M. R. Hemm y G. Storz, (2008) Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 579-589, Table of Contents.
- Fozo, E. M.; K. S. Makarova; S. A. Shabalina; N. Yutin; E. V. Koonin y G. Storz, (2010) Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic acids research* 38: 3743-3759.
- Funnell, B. E.; T. A. Baker y A. Kornberg, (1986) Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *The Journal of biological chemistry* 261: 5616-5624.
- Garcillan-Barcia, M. P.; M. V. Francia y F. de la Cruz, (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS microbiology reviews* 33: 657-687.
- Garner, M. M. y A. Revzin, (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic acids research* 9: 3047-3060.
- Gerdes, K., (2000) Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *Journal of bacteriology* 182: 561-572.

- Gerdes, K.; S. K. Christensen y A. Lobner-Olsen, (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 371-382.
- Gerdes, K.; M. Howard y F. Szardenings, (2010) Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation. *Cell* 141: 927-942.
- Gerdes, K.; J. E. Larsen y S. Molin, (1985) Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *Journal of bacteriology* 161: 292-298.
- Gerdes, K.; A. Nielsen; P. Thorsted y E. G. Wagner, (1992) Mechanism of killer gene activation. Antisense RNA-dependent RNase III cleavage ensures rapid turn-over of the stable *hok*, *srnB* and *pndA* effector messenger RNAs. *Journal of molecular biology* 226: 637-649.
- Gerdes, K.; P. B. Rasmussen y S. Molin, (1986) Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 3116-3120.
- Gerdes, K. y E. G. Wagner, (2007) RNA antitoxins. *Current opinion in microbiology* 10: 117-124.
- Giraldo, R., (2003) Common domains in the initiators of DNA replication in Bacteria, Archaea and Eukarya: combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS microbiology reviews* 26: 533-554.
- Giraldo, R. y R. Diaz-Orejas, (2001) Similarities between the DNA replication initiators of Gram-negative bacteria plasmids (RepA) and eukaryotes (Orc4p)/archaea (Cdc6p). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 4938-4943.
- Giraldo, R. y R. Diaz, (1992) Differential binding of wild-type and a mutant RepA protein to *oriR* sequence suggests a model for the initiation of plasmid R1 replication. *Journal of molecular biology* 228: 787-802.
- Giraldo, R.; C. Fernandez-Tornero; P. R. Evans; R. Diaz-Orejas y A. Romero, (2003) A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization domain. *Nature structural biology* 10: 565-571.
- Giraldo, R. y M. E. Fernandez-Tresguerres, (2004) Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. *Plasmid* 52: 69-83.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166: 557-580.

- Hargreaves, D.; R. Giraldo; S. Santos-Sierra; R. Boelens; D. W. Rice; R. Díaz-Orejas y J. B. Rafferty, (2002a) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the parD-encoded protein Kid from *Escherichia coli* plasmid R1. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 58: 355-358.
- Hargreaves, D.; S. Santos-Sierra; R. Giraldo; R. Sabariego-Jareño; G. de la Cueva-Mendez; R. Boelens; R. Díaz-Orejas y J. B. Rafferty, (2002b) Structural and functional analysis of the kid toxin protein from *E. coli* plasmid R1. 10: 1425-1433.
- Hashimoto, T. y M. Sekiguchi, (1976) Isolation of temperature-sensitive mutants of R plasmid by in vitro mutagenesis with hydroxylamine. *Journal of bacteriology* 127: 1561-1563.
- Hayes, F. y L. Van Melder, (2011) Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 46: 386-408.
- Hill, T. M.; A. J. Pelletier; M. L. Tecklenburg y P. L. Kuempel, (1988) Identification of the DNA sequence from the *E. coli* terminus region that halts replication forks. *Cell* 55: 459-466.
- Jensen, R. B.; E. Grohmann; H. Schwab; R. Díaz-Orejas y K. Gerdes, (1995) Comparison of *ccd* of F, *parDE* of RP4, and *parD* of R1 using a novel conditional replication control system of plasmid R1. *Molecular microbiology* 17: 211-220.
- Kamada, K.; F. Hanaoka y S. K. Burley, (2003) Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Molecular cell* 11: 875-884.
- Kamphuis, M. B.; A. M. Bonvin; M. C. Monti; M. Lemonnier; A. Muñoz-Gómez; R. H. van den Heuvel; R. Díaz-Orejas y R. Boelens, (2006) Model for RNA binding and the catalytic site of the RNase Kid of the bacterial parD toxin-antitoxin system. *Journal of molecular biology* 357: 115-126.
- Kamphuis, M. B.; M. C. Monti; R. H. van den Heuvel; S. Santos-Sierra; G. E. Folkers; M. Lemonnier; R. Díaz-Orejas; A. J. Heck y R. Boelens, (2007) Interactions between the toxin kid of the bacterial parD system and the antitoxins Kis and MazE. *Proteins*.
- Kollek, R.; W. Oertel y W. Goebel, (1978) Isolation and characterization of the minimal fragment required for autonomous replication ("basic replicon") of a copy mutant (pKN102) of the antibiotic resistance factor R1. *Mol Gen Genet* 162: 51-57.
- Koppes, L. y K. Nordstrom, (1986) Insertion of an R1 plasmid into the origin of replication of the *E. coli* chromosome: random timing of replication of the hybrid chromosome. *Cell* 44: 117-124.

- Labrie, S. J.; J. E. Samson y S. Moineau, (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature reviews* 8: 317-327.
- Lacadena, J.; A. Martinez del Pozo; V. Lacadena; A. Martinez-Ruiz; J. M. Mancheno; M. Onaderra y J. G. Gavilanes, (1998) The cytotoxin alpha-sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease. *FEBS letters* 424: 46-48.
- Lederberg, E. M. y S. N. Cohen, (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of bacteriology* 119: 1072-1074.
- Lee, C. L.; D. S. Ow y S. K. Oh, (2006) Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *Journal of microbiological methods* 65: 258-267.
- Lemonnier, M.; S. Santos-Sierra; C. Pardo-Abarrio y R. Diaz-Orejas, (2004) Identification of residues of the kid toxin involved in autoregulation of the parD system. *Journal of bacteriology* 186: 240-243.
- Leplae, R.; D. Geeraerts; R. Hallez; J. Guglielmini; P. Dreze y L. Van Melderen, (2011) Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic acids research* 39: 5513-5525.
- Lioy, V. S.; F. Pratto; A. B. de la Hoz; S. Ayora y J. C. Alonso, (2010) Plasmid pSM19035, a model to study stable maintenance in Firmicutes. *Plasmid* 64: 1-17.
- Lopez-Villarejo, J.; E. Diago-Navarro; A. M. Hernandez-Arriaga y R. Diaz-Orejas, (2012) Kis antitoxin couples plasmid R1 replication and parD (kis,kid) maintenance modules. *Plasmid* 67: 118-127.
- Llosa, M.; F. X. Gomis-Ruth; M. Coll y F. de la Cruz Fd, (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular microbiology* 45: 1-8.
- Madl, T.; L. Van Melderen; N. Mine; M. Respondek; M. Oberer; W. Keller; L. Khatai y K. Zangger, (2006) Structural basis for nucleic acid and toxin recognition of the bacterial antitoxin CcdA. *Journal of molecular biology* 364: 170-185.
- Magnuson, R. y M. B. Yarmolinsky, (1998) Corepression of the P1 addiction operon by Phd and Doc. *Journal of bacteriology* 180: 6342-6351.
- Masai, H. y K. Arai, (1988) RepA protein- and oriR-dependent initiation of R1 plasmid replication: identification of a rho-dependent transcription terminator required for cis-action of repA protein. *Nucleic acids research* 16: 6493-6514.

- Masai, H.; Y. Kaziyo y K. Arai, (1983) Definition of oriR, the minimum DNA segment essential for initiation of R1 plasmid replication in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 6814-6818.
- Maxam, A. M. y W. Gilbert, (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in enzymology* 65: 499-560.
- Meynell, E. y N. Datta, (1966) The relation of resistance transfer factors to the F-factor (sex-factor) of *Escherichia coli* K12. *Genetical research* 7: 134-140.
- Miller, E. M. y J. A. Nickoloff, (1995) *Escherichia coli* electrotransformation. *Methods Mol Biol* 47: 105-113.
- Miller, J., (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*.
- Molin, S.; P. Stougaard; B. E. Uhlin; P. Gustafsson y K. Nordstrom, (1979) Clustering of genes involved in replication, copy number control, incompatibility, and stable maintenance of the resistance plasmid R1drd-19. *Journal of bacteriology* 138: 70-79.
- Moller-Jensen, J.; R. B. Jensen; J. Lowe y K. Gerdes, (2002) Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *The EMBO journal* 21: 3119-3127.
- Monti, M. C.; A. M. Hernandez-Arriaga; M. B. Kamphuis; J. Lopez-Villarejo; A. J. Heck; R. Boelens; R. Diaz-Orejas y R. H. van den Heuvel, (2007) Interactions of Kid-Kis toxin-antitoxin complexes with the parD operator-promoter region of plasmid R1 are piloted by the Kis antitoxin and tuned by the stoichiometry of Kid-Kis oligomers. *Nucleic acids research* 35: 1737-1749.
- Muñoz-Gomez, A. J.; M. Lemonnier; S. Santos-Sierra; A. Berzal-Herranz y R. Diaz-Orejas, (2005) RNase/anti-RNase activities of the bacterial parD toxin-antitoxin system. *Journal of bacteriology* 187: 3151-3157.
- Muñoz-Gomez, A. J.; S. Santos-Sierra; A. Berzal-Herranz; M. Lemonnier y R. Diaz-Orejas, (2004) Insights into the specificity of RNA cleavage by the *Escherichia coli* MazF toxin. *FEBS letters* 567: 316-320.
- Nakamura, A.; C. Wada y K. Miki, (2007) Structural basis for regulation of bifunctional roles in replication initiator protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 18484-18489.
- Nordstrom, K., (2006) Plasmid R1--replication and its control. *Plasmid* 55: 1-26.
- Nordstrom, K. y K. Gerdes, (2003) Clustering versus random segregation of plasmids lacking a partitioning function: a plasmid paradox? *Plasmid* 50: 95-101.

- Nordstrom, K.; S. Molin y H. Aagaard-Hansen, (1980) Partitioning of plasmid R1 in *Escherichia coli*. I. Kinetics of loss of plasmid derivatives deleted of the par region. *Plasmid* 4: 215-227.
- Nordstrom, M. y K. Nordstrom, (1985) Control of replication of FII plasmids: comparison of the basic replicons and of the *copB* systems of plasmids R100 and R1. *Plasmid* 13: 81-87.
- Ortega, S.; E. Lanka y R. Diaz, (1986) The involvement of host replication proteins and of specific origin sequences in the in vitro replication of miniplasmid R1 DNA. *Nucleic acids research* 14: 4865-4879.
- Overgaard, M.; J. Borch; M. G. Jorgensen y K. Gerdes, (2008) Messenger RNA interferase RelE controls relBE transcription by conditional cooperativity. *Molecular microbiology* 69: 841-857.
- Paulsson, J. y M. Ehrenberg, (2000) Molecular clocks reduce plasmid loss rates: the R1 case. *Journal of molecular biology* 297: 179-192.
- Pimentel, B.; M. A. Madine y G. de la Cueva-Mendez, (2005) Kid cleaves specific mRNAs at UUACU sites to rescue the copy number of plasmid R1. *The EMBO journal* 24: 3459-3469.
- Projan, S. J.; S. Carleton y R. P. Novick, (1983) Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid* 9: 182-190.
- Riise, E. y S. Molin, (1986) Purification and characterization of the CopB replication control protein, and precise mapping of its target site in the R1 plasmid. *Plasmid* 15: 163-171.
- Rosen, J.; T. Ryder; H. Inokuchi; H. Ohtsubo y E. Ohtsubo, (1980) Genes and sites involved in replication and incompatibility of an R100 plasmid derivative based on nucleotide sequence analysis. *Mol Gen Genet* 179: 527-537.
- Ruiz-Echevarria, M. J.; A. Berzal-Herranz; K. Gerdes y R. Diaz-Orejas, (1991) The *kis* and *kid* genes of the *parD* maintenance system of plasmid R1 form an operon that is autoregulated at the level of transcription by the co-ordinated action of the Kis and Kid proteins. *Molecular microbiology* 5: 2685-2693.
- Ruiz-Echevarria, M. J.; G. de-la-Cueva y R. Diaz-Orejas, (1995a) Translational coupling and limited degradation of a polycistronic messenger modulate differential gene expression in the *parD* stability system of plasmid R1. *Molecular & General Genetics* : Mgg 248: 599-609.
- Ruiz-Echevarria, M. J.; M. A. de-la-Torre y R. Diaz-Orejas, (1995b) A mutation that decreases the efficiency of plasmid R1 replication leads to the activation of *parD*, a killer stability system of the plasmid. *Fems Microbiology Letters* 130: 129-135.

- Ruiz-Echevarria, M. J.; G. Gimenez-Gallego; R. Sabariego-Jareño y R. Díaz-Orejas, (1995c) Kid, a small protein of the *parD* stability system of plasmid R1, is an inhibitor of DNA replication acting at the initiation of DNA synthesis. *Journal of molecular biology* 247: 568-577.
- Ryder, T. B.; D. B. Davidson; J. I. Rosen; E. Ohtsubo y H. Ohtsubo, (1982) Analysis of plasmid genome evolution based on nucleotide-sequence comparison of two related plasmids of *Escherichia coli*. *Gene* 17: 299-310.
- Sambrook, J.; E. F. Fritsch y T. Maniatis, (1989) Molecular cloning. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*.
- Sambrook, J. y R. Pollack, (1974) Basic methodology for cell culture--cell transformation. *Methods in enzymology* 32: 583-592.
- Sanger, F.; S. Nicklen y A. R. Coulson, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Santos-Sierra, S., (2002) Análisis genético y bioquímico de las proteínas Kis y Kid del sistema *parD* del plásmido R1. *Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid, Madrid*.
- Santos-Sierra, S.; M. Lemonnier; B. Nunez; D. Hargreaves; J. Rafferty; R. Giraldo; J. M. Andreu y R. Díaz-Orejas, (2003) Non-cytotoxic variants of the Kid protein that retain their auto-regulatory activity. *Plasmid* 50: 120-130.
- Santos-Sierra, S.; C. Pardo-Abarrio; R. Giraldo y R. Díaz-Orejas, (2002) Genetic identification of two functional regions in the antitoxin of the *parD* killer system of plasmid R1. *Fems Microbiology Letters* 206: 115-119.
- Schumacher, M. A., (2012) Bacterial plasmid partition machinery: a minimalist approach to survival. *Current opinion in structural biology* 22: 72-79.
- Smith, A. B.; J. Lopez-Villarejo; E. Diago-Navarro; L. A. Mitchenall; A. Barendregt; A. J. Heck; M. Lemonnier; A. Maxwell y R. Díaz-Orejas, (2012) A Common Origin for the Bacterial Toxin-Antitoxin Systems *parD* and *ccd*, Suggested by Analyses of Toxin/Target and Toxin/Antitoxin Interactions. *PloS one* 7: e46499.
- Steyaert, J., (1997) A decade of protein engineering on ribonuclease T1--atomic dissection of the enzyme-substrate interactions. *Eur J Biochem* 247: 1-11.
- Summers, D. K. y D. J. Sherratt, (1984) Multimerization of high copy number plasmids causes instability: *ColE1* encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* 36: 1097-1103.

- Thompson, J. D.; T. J. Gibson; F. Plewniak; F. Jeanmougin y D. G. Higgins, (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* 25: 4876-4882.
- Tsuchimoto, S.; Y. Nishimura y E. Ohtsubo, (1992) The stable maintenance system pem of plasmid R100: degradation of PemI protein may allow PemK protein to inhibit cell growth. *Journal of bacteriology* 174: 4205-4211.
- Uhlin, B. E. y K. Nordstrom, (1985) Preferential inhibition of plasmid replication in vivo by altered DNA gyrase activity in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 162: 855-857.
- Van Melderén, L. y A. Aertsen, (2009) Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis. *Research in microbiology* 160: 645-651.
- Van Melderén, L. y M. Saavedra De Bast, (2009) Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS genetics* 5: e1000437.
- Van_Melderén, L.; P. Bernard y M. Couturier, (1994) Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Molecular microbiology* 11: 1151-1157.
- von Meyenburg, K.; F. G. Hansen; E. Riise; H. E. Bergmans; M. Meijer y W. Messer, (1979) Origin of replication, oriC, of the *Escherichia coli* K12 chromosome: genetic mapping and minichromosome replication. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 43 Pt 1: 121-128.
- Yanisch-Perron, C.; J. Vieira y J. Messing, (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Yoshikawa, M., (1974) Identification and mapping of the replication genes of an R factor, R100-1, integrated into the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 118: 1123-1131.
- Zhang, J.; Y. Zhang; L. Zhu; M. Suzuki y M. Inouye, (2004) Interference of mRNA function by sequence-specific endoribonuclease PemK. *The Journal of biological chemistry* 279: 20678-20684.

A.- ANEXOS

A.- ANEXO 1.

Molecule: pKN1562 cir, 11267 bps DNA Circular
File Name: pKN1562.cm5, dated 24 Sep 2012
Description: pKN1562 Circularized
Printed: 1 to 11267 bps (Full)

```
1  gcattgtaag tgcaggatgg tgtgactgat cttcaccaaaa cgtattaccg ccaggtaaag
   cgtaacattc acgtcctacc acactgacta gaagtggttt gcataatggc ggtccatttc
               >>.....repA.....>
               v t d l h q t y y r q v k
>..tap.>>
a l -

61  aaccggaatc cggtgttcac tccccgtgaa ggtgccggaa cgctgaagtt ctgcgaaaaa
   ttgggcttag gccacaagtg aggggcactt ccacggcctt gcgacttcaa gacgcttttt
>.....repA.....>
n p n p v f t p r e g a g t l k f c e k

121 ctgatggaaa aggcgggtggg cttcacctcc cgttttgatt tgcgccattca tgtggcgcac
   gactaccttt tccgccaccc gaagtggagg gcaaaaactaa agcggtaaagt acaccgcgta
>.....repA.....>
l m e k a v g f t s r f d f a i h v a h

181 gcccgttccc gtggtctgcg tgggcgcacg ccaccgggtgc tgcgtcgacg ggctattgat
   cgggcaaggg caccagacgc agccgcgtac ggtggccacg acgcagctgc ccgataacta
>.....repA.....>
a r s r g l r r r m p p v l r r r a i d

241 gcgctgctgc aggggctgtg tttccactat gacccgctgg ccaaccgcgt ccagtgttcc
   cgcgacgacg tccccgacac aaaggtgata ctgggcgacc ggttggcgca ggtcacaagg
>.....repA.....>
a l l q g l c f h y d p l a n r v q c s

301 atcaccacac tggccattga gtgcggactg gcgacagagt ccggtgcagg aaaactctcc
   tagtgggtgtg accggtaact cacgcctgac cgctgtctca ggccacgtcc ttttgagagg
>.....repA.....>
i t t l a i e c g l a t e s g a g k l s

361 atcaccctgt ccaccggggc cctgacgttc ctgtcagagc tgggactgat tacctaccag
   tagtgggcac ggtgggcccg ggactgcaag gacagtctcg accctgacta atggatggtc
>.....repA.....>
i t r a t r a l t f l s e l g l i t y q

421 acggaatatg acccgcttat cgggtgctac attccgaccg acatcacgtt cacactggct
   tgccttatac tgggcgaata gccacgatg taaggctggc tgtagtcaa gtgtgaccga
>.....repA.....>
t e y d p l i g c y i p t d i t f t l a

481 ctgtttgctg cccttgatgt gtctgaggat gcagtggcag ctgcgcgccg cagtcgtgtt
   gacaaacgac ggggaactaca cagactccta cgtcaccgtc gacgcgcggc gtcagcacia
>.....repA.....>
l f a a l d v s e d a v a a a r r s r v

541 gaatgggaaa acaaacagcg caaaaagcag gggctggata ccctgggtat ggatgagctg
   cttacccttt tgtttgtcgc gtttttcgtc cccgacctat gggacccata cctactcgac
>.....repA.....>
e w e n k q r k k q g l d t l g m d e l

601 atagcgaaaag cctggcgttt tgtgcgtgag cgtttccgca gttaccagac agagcttaag
   tatcgctttc ggaccgcaaa acacgcactc gaaaaggcgt caatggctctg tctcgaattc
>.....repA.....>
i a k a w r f v r e r f r s y q t e l k
```

```

661  tcccgtggaa taaaacgtgc ccgtgcgcgt cgtgatgcga acagagaacg tcaggatatc
    agggcacctt attttgcacg ggcacgcgca gcactacgct tgtctcttgc agtcctatag
    >.....repA.....>
      s r g i k r a r a r r d a n r e r q d i

721  gtcaccctgg tgaaacggca gctgacgcgt gaaatctcgg aaggacgctt cactgctaatt
    cagtgggacc actttgccgt cgactgcgca ctttagagcc ttcctgcgaa gtgacgatta
    >.....repA.....>
      v t l v k r q l t r e i s e g r f t a n

781  ggtgaggcgg taaaacgcga agtggagcgt cgtgtgaagg agcgcgatgat tctgtcacgt
    ccactccgcc attttgcgct tcacctcgca gcacacttcc tcgcgtaacta agacagtgcga
    >.....repA.....>
      g e a v k r e v e r r v k e r m i l s r

841  aaccgcaatt acagccgggt ggccacagct tctccctgaa agtgatctcc tcagaataat
    ttggcggttaa tgtcggccga ccggtgtcga agagggaactt tcactagagg agtcttatta
    >.....repA.....>
      n r n y s r l a t a s p -

901  ccggcctgcg ccggaggcat ccgcacgcct gaagcccgcc ggtgcacaaa aaaacagcgt
    ggccggagcg ggccctccgta ggcgtgcgga cttcgggcgg ccacgtgttt ttttgcgca

961  cgcattgcaa aaacaatctc atcatccacc ttctggagca tccgattccc cctgttttta
    gcgtacgttt tttgttagag tagtaggtgg aagacctcgt aggctaaggg ggacaaaaat

1021 atacaaaata cgccctcagcg acgggggaatt ttgcttatcc acatttaact gcaagggact
    tatgttttat gcggagtcgc tgcccccttaa aacgaatagg tgtaaatga cgttccctga
    >>dnaA .>>
      l s t
    >>....oriR1.....>
      f n c k g

1081 tccccataag gttacaaccg ttcatgtcat aaagcgccag ccgccagtct tacaggggtgc
    aggggtattc caatgttggc aagtacagta ttctgcggtc ggcggtcaga atgtcccacg
    >.....oriR1.....>
    l p h k v t t v h v i k r q p p v l q g

1141 aatgtatctt ttaaacacct gtttatatct cttttaaaact acttaattac attcatttaa
    ttacatagaa aatttgtgga caaatataga ggaaatttga tgaattaatg taagtaaatt
    >...oriR1..>>
    a m y l

1201 aaagaaaacc tattcactgc ctgtcctgtg gacagacaga tatgcacctc ccaccgcaag
    tttcttttgg ataagtgacg gacaggacac ctgtctgtct atacgtggag ggtggcgctc
    >>.....RepA4.....>
      m h l p p q

1261 cgggcgggccc cgaccggagc cacttttagtt acaacacaca aaaacaacct ccagaaaaac
    gccgcccggg gctggcctcg gtgaaatcaa tgttgtgtgt ttttgttga ggtctttttg
    >.....RepA4.....>
    a a g p d r s h f s y n t q k q p p e k

1321 cccgggtccag cgcagaaccg aaaccacaaa gccctccct cataactgaa aagcggcccc
    gggccaggtc gcgtcttggc tttggtgttt cggggaggga gtattgactt ttcgccgggg
    >.....RepA4.....>
    p r s s a e p k p q s p s l i t e k r p

1381 gccccggccc aaagggccgg aacagagtcg cttttaatta tgaatgttgt aactacatct
    cggggccggg tttcccgccc ttgtctcagc gaaaattaat acttacaaca ttgatgtaga
    >.....RepA4.....>
    r p g p k g r n r v a f n y e c c n y i

```

```

1441  tcatcgctgt cagtcttctc gctggaagtt ctacgtacac gctcgtaagc ggccctcacg
      agtagcgaca gtcagaagag cgaccttcaa gagtcatgtg cgagcattcg ccgggagtg
      >.....RepA4.....>
      f i a v s l l a g s s q y t l v s g p h

1501  gcccgctaac gcggagatac gccccgactt cgggtaaacc ctcgtcggga ccaactccgac
      cgggcgattg cgccctctatg cggggctgaa gcccatattg gagcagccct ggtgaggctg
      >.....RepA4.....>
      g p l t r r y a p t s g k p s s g p l r

1561  cgcgcacaga agctctctca tggctgaaag cgggtatggt ctggcagggc tggggatggg
      gcgcgtgtct tcgagagagt accgactttc gcccatacca gaccgtcccg acccctaccc
      >.....RepA4.....>
      p r t e a l s w l k a g m v w q g w g w

1621  taaggtgaaa tctatcaatc agtaccggct tacgccgggc ttcggcggtt ttactcctgt
      attccacttt agatagttag tcatggccga atgcggcccg aagccgccaa aatgaggaca
      >.....>> RepA4
      v r -

1681  atcatatgaa acaacagagt gccgccttcc atgccgctga tgcggcatat cctggtaacg
      tagtatactt tgttgtctca cggcggaagg tacggcgact acgccgtata ggaccattgc

1741  atatctgaat tggtatacat gtgtatatac gtggtaatga caaaaatagg acaagttaaa
      tatagactta acaatatgta cacatatatg caccattact gtttttatcc tgttcaattt

1801  aatttacagg cgatgcaatg attcaaacac gtaatcaata tctgcagttt atgctggtta
      ttaaattgtcc gctacgttac taagtttgtg cattagttat agacgtcaaa tacgaccaat
      >>...tir.....>
      f m l v

1861  tgctggctgc atggggcatt agttggggag ccagatttgt catggagcag gccgttctgc
      acgaccgacg taccocgtaa tcaacccctc ggtctaaaca gtacctcgtc cggcaagacg
      >.....tir.....>
      m l a a w g i s w g a r f v m e q a v l

1921  tttatggatc agggaaaaaac tatttgttct tcagtcattg tactgttctg atgtacctgc
      aaatacctag tccttttttg ataaacaaga agtcagtacc atgacaagac tacatggacg
      >.....tir.....>
      l y g s g k n y l f f s h g t v l m y l

1981  tgtgtgtttt cctggatatac cgccgttggg tagctccgct accggtcgtt ggtcagctgc
      acacacaaaa ggaccatatg gcggcaacct atcgaggcga tggccagcaa ccagtcgacg
      >.....tir.....>
      l c v f l v y r r w i a p l p v v g q l

2041  gcaacgttgg cgtaccgtgg ctggctcgtg cgatggccgt ggtgtatgtc ggtgtatttc
      cgttgcaacc gcatggcacc gaccagccac gctaccggca ccacatacag ccacataaag
      >.....tir.....>
      r n v g v p w l v g a m a v v y v g v f

2101  tgctcggtaa ggcgctggct ctgcctgctg agccatttat gacgaaactt tttgccgata
      acgagccatt ccgcgaccga gacggacgac tcggtaaata ctgctttgaa aaacggctat
      >.....tir.....>
      l l g k a l a l p a e p f m t k l f a d

2161  agtccatacc tgacgtgata ctgacgttgc tgaccatctt tatccttgcc ccgttgaatg
      tcaggatagg actgcactag gactgcaacg actggtagaa ataggaacgg ggcaacttac
      >.....tir.....>
      k s i p d v i l t l l t i f i l a p l n

2221  aggaaacgct gttccggggg attatgctga acgtcttccg ttcacggtag tgctggacga
      tcctttgcga caaggccccc taatacgact tgcagaaggc aagtgccatg acgacctgct
      >.....tir.....>
      e e t l f r g i m l n v f r s r y c w t

```

```

2281  tgtggctggg ggcgctgata acgtcgttgt tggtcgtcgc cgcgcacagc cagtatcaga
      acaccgaccc ccgcgactat tgcagcaaca acaagcagcg gcgcgtgtcg gtcatatgtct
      >.....tir.....>
      m w l g a l i t s l l f v a a h s q y q

2341  acctgctgac actggcagaa ctgttcctgg tggggttgat tacatcagtg gccaggatca
      tggacgactg tgaccgtctt gacaaggacc accccaacta atgtagtcac cggtcctagt
      >.....tir.....>
      n l l t l a e l f l v g l i t s v a r i

2401  gaagtgggtg cctgctgctg ccggtattgc tgcatatgga agcaaccacg ctgggtttac
      cttcaccacc ggacgacgac ggccataacg acgtatacct tcgttgggtg gacccaaatg
      >.....tir.....>
      r s g g l l l p v l l h m e a t t l g l

2461  tgtttggttg aaagttatat ttttattaaa cattgtgcgt taaagcctgg tgtgtttttt
      acaaaccaac tttcaatata aaaataattt gtaacacgca atttcggacc acacaaaaaa
      >...tir...>>
      l f g -

2521  tagtggatgt tataatttaa Swal tataactttt atggaggtga agaatgcata ccacccgact
      atcacctaca atataaattt atattgaaaa tacctccact tcttacgtat ggtgggctga
      >>.....kis.....>
      m h t t r

2581  gaagaggggtt ggcggctcag ttatgctgac cgtcccaccg gcactgctga atgcgctgtc
      cttctcccaa ccgccgagtc aatacgactg gcagggtggc cgtgacgact tacgcgacag
      >.....kis.....>
      l k r v g g s v m l t v p p a l l n a l

2641  tctgggcaca gataatgaag ttggcatggt cattgataat ggccggctga ttgttgagcc
      agaccggtgt ctattacttc aaccgtacca gtaactatta ccggccgact aacaactcgg
      >.....kis.....>
      s l g t d n e v g m v i d n g r l i v e

2701  gtacagacgc ccgcaatatt cactggctga gctactggca cagtgtgatc cgaatgctga
      catgtctgcg ggcgttataa gtgaccgact cgatgaccgt gtcacactag gcttacgact
      >.....kis.....>
      p y r r p q y s l a e l l a q c d p n a

2761  aatatcagct gaagaacgag aatggctgga tgcaccggcg actggtcagg aggaaatctg
      ttatagtcga cttcttgctc ttaccgacct acgtggccgc tgaccagtcc tccttagac
      >.....kis.....>
      e i s a e e r e w l d a p a t g q e e i

2821  acatggaaag aggggaaatc tggcttgtct cgcttgatcc taccgcaggt catgagcagc
      tgtacctttc tcccttttag accgaacaga gcgaactagg atggcgtcca gtactcgtcg
      > kis
      -
      >>.....kid.....>
      m e r g e i w l v s l d p t a g h e q

2881  agggaaacgc gccggtgctg attgtcacac cggcggcctt taatcgctg acccgctgct
      tcccttgccg ccggccacgac taacagtgtg gccgcgggaa attagcgcac tgggcggacg
      >.....kid.....>
      q g t r p v l i v t p a a f n r v t r l

2941  ctgttgttgt gcccgtaacc agcggaggca attttgccc cactgccggc tttgcggtgt
      gacaacaaca cgggcattgg tcgcctccgt taaaacgggc gtgacggccg aaacgccaca
      >.....kid.....>
      p v v v p v t s g g n f a r t a g f a v

```

SnaBI

3001 cgttggatgg tgttggcata cgtaccacag gtgttgtacg ttgcgatcaa ccccgacaa
gcaacctacc acaaccgtat gcatgggtgc cacaacatgc aacgctagtt ggggcctgtt
>.....kid.....>
s l d g v g i r t t g v v r c d q p r t

3061 ttgatatgaa agcacggggc ggaaaacgac tcgaacgggt tccggagact atcatgaacg
aactatactt tcgtgccccg ccttttgcgt agcttgccca aggcctctga tagtacttgc
>.....kid.....>
i d m k a r g g k r l e r v p e t i m n

3121 aagttcttgg ccgcctgtcc actattctga cttgaacatg gggtttgagg ggcaactgga
ttcaagaacc ggcgagacagg tgataagact gaacttgtac cccaaactcc ccgttgacct
>.....kid.....>>
e v l g r l s t i l t -

BsiWI

3181 tgaaaacgta cgatttaggg cactaaaacc gctgttgtcc caccattctg gtgattccca
acttttgcac gctaaatccc gtgattttgg cgacaacagg gtggtgaagac cactaagggt

EcoRI

3241 aacgttattt ggctaaaaag tagttttgat gtggtttatt ttccgaattc caagcgcagc
ttgcaataaa ccgatttttc atcaaaaacta caccaaataa aaggcttaag gttcgcgtcg

3301 cctactttct tgtgcgtatt tgcgtgtttt gcgcagtttt gaagttccta catcagattg
ggatgaaaga acacgcataa acgcacaaaa cgcgtcaaaa cttaaggat gtagtctaac

3361 acttcggata caaattcaat gaacattgat gcaaatactg acctatcagt ttcttaacta
tgaagcctat gttaagtta cttgtaacta cgtttatgac tggatagtca aagaattgat

3421 aatactcgag atacatctaa tggctaataa aaacttagat attgactcca agacagcaga
ttatgagctc tatgtagatt accgattact tttgaatcta taactgaggt tctgtcgtct
>>.....ORF-1.....>
m a n e n l d i d s k t a

3481 agaattatac gagtggatc tggatgataa attaattata aatcgaagat accaaagaaa
tcttaatatg ctcaccatag acctactatt taattaatat ttagcttcta tggtttcttt
>.....ORF-1.....>
e e l y e w y l d d k l i i n r r y q r

3541 attagtatgg tccctcgaag agaaaacagc actgatttca tcaatgactc agcaataccc
taatcatacc aggagcttc tcttttgcgt tgactaaagt agttactgag tcgttatggg
>.....ORF-1.....>
k l v w s l e e k t a l i s s m t q q y

3601 tatccctttg ctattgtttg tttccattga caacaaaaga gaaatccttg atggaatgca
atagggaaac gataacaaac aaaggtaact gttgttttct ctttaggaac taccttacct
>.....ORF-1.....>
p i p l l l f v s i d n k r e i l d g m

3661 aagactagaa gctttaatga gttttattga gcagcgattt tcattaaatg gttaaatactt
ttctgatctt cgaaattact caaaataact cgtcgctaaa agtaatttac catttatgaa
>.....ORF-1.....>
q r l e a l m s f i e q r f s l n g k y

3721 taatttagat gccattgcat taacaaaaca actaaaagac agtggtaaac ttcaacaaaa
attaaatcta cggtaacgta attgttttgt tgattttctg tcaccatttg aagttgtttt
>.....ORF-1.....>
f n l d a i a l t k q l k d s g k l q q

3781 agagccagtg ctatcccgcg aaagttctac attaattgct cgctatagat ttgctatatc
tctcggtcac gatagggcgc tttcaagatg taattaacga gcgatatcta aacgatatag
>.....ORF-1.....>
k e p v l s r e s s t l i a r v r f a i

```

3841 tgaataactct tcaacagagg accacattga cgaagtgttt cgacgcataa attccaatgg
acttatgaga agttgtctcc tgggtgtaact gcttcacaaa gctgcgtatt taagggtacc
>.....ORF-1.....>
s e y s s t e d h i d e v f r r i n s n

3901 taaaatttta tcaaaacaag aactacgaag tgcgggggtgc gttagtaatt tttcagagtt
attttaaaat agttttgttc ttgatgtctc acgccccacg caatcattaa aaagtctcaa
>.....ORF-1.....>
g k i l s k q e l r s a g c v s n f s e

3961 agtaaggaaa atatcgacaa ttataagagg agatactaca catagcgata taatgggact
tcattccttt tatagctgtt aatattctcc tctatgatgt gtatcgctat attaccctga
>.....ORF-1.....>
l v r k i s t i i r g d t t h s d i m g

4021 gaataaaata cataacatat caatttgcaa tgatggactc gattatggaa taaatataga
cttattttat gtattgtata gttaaacgtt actacctgag ctaatacctt atttatactc
>.....ORF-1.....>
l n k i h n i s i c n d g l d y g i n i

4081 caatcatttc tatattagaa atcatatcat tagtaggcct agcattagag actctgacga
gttagtaaag atataatctt tagtatagta atcatccgga tcgtaatctc tgagactgct
>.....ORF-1.....>
d n h f y i r n h i i s r p s i r d s d

4141 tgaagagtta gttgcaaata tcttgggcta tatattttta gatgataagc caacatcagg
acttctcaat caacgtttat agaaccgat atataaaaat ctactattcg gttgtagtcc
>.....ORF-1.....>
d e e l v a n i l g y i f l d d k p t s

4201 atcaacatcg ctcgatacat tttacgggtga aggttcgacg agtcatgcaa tccatacacg
tagttgtagc gagctatgta aaatgccact tccaagctgc tcagtacgtt aggtatgtgc
>.....ORF-1.....>
g s t s l d t f y g e g s t s h a i h t

4261 aactcaatta gagaattaca ttcagacaaa tgggtgcagat aaaattgtca ataattacct
ttgagttaat ctcttaatgt aagtctgttt accacgtcta ttttaacagt tattaatgga
>.....ORF-1.....>
r t q l e n y i q t n g a d k i v n n y

4321 cttcgtttat gagatgattc aaaaattatt tgatgcaaat aatttgaact ttagatcaca
gaagcaaata ctctactaag tttttaataa actacgttta ttaaacttga aatctagtgt
>.....ORF-1.....>
l f v y e m i q k l f d a n n l n f r s

4381 cattctgggc aatgcatctt catctcaaga atgtcctcgt tactatcaag ctgtttttct
gtaagaccgc ttacgtagaa gtagagttct tacaggagca atgatagtgc gacaaaaaga
>.....ORF-1.....>
h i l g n a s s s q e c p r y y q a v f

4441 tgctttgtat gaattaatca taaatgaaaa catgcaactt gacgatgaac agaaatttat
acgaaacata cttaattagt atttactttt gtacgttgaa ctgctacttg tctttaaata
>.....ORF-1.....>
l a l y e l i i n e n m q l d d e q k f

4501 cgctcagtta ggagacagtg tacaacgttc aatgggtgcaa accgaagggg gccgttgggc
gcgagtcaat cctctgtcac atgttgcaag ttaccacgtt tggcttcccc cggcaaccgc
>.....ORF-1.....>
i a q l g d s v q r s m v q t e g g r w

4561 agctagcgct cgtcagaaaa gtgtcgaaaga tttatgtgct ttaatcagac gatatttttaa
tcgatcgcg gacgtctttt cacagcttct aaatacacga aattagtctg ctataaaatt
>.....ORF-1.....>
a a s a r q k s v e d l c a l i r r y f

```



```

4621  agaatcagaa aataaattta tcaatcatgc ttggcaaaca ctgataagaa ctctacttaa
      tcttagtctt ttattttaa atgtagtacg aaccgtttgt gactattctt gagatgaatt
      >.....ORF-1.....>
      k e s e n k f i n h a w q t l i r t l l

4681  taactcaaga acagaacaac caaattatga ttttaaacag ggaggtgatg ctgccaaactt
      attgagttct tgtcttggtg gtttaatact aaaatttgtc cctccactac gacgggtgaa
      >.....ORF-1.....>
      n n s r t e q p n y d f k q g g d a a n

4741  actgatttag tgtatgatgg tgtttttgag gtgctccagt ggcttctgtt tctatcagct
      tgactaaatc acatactacc acaaaaactc cacgaggtca ccgaagacaa agatagtcga
      >.ORF-1.>>
      l l i -

                                     >>.....Ins A.....>
                                     v a s v s i s

4801  gtccctcctg ttcagctact gacggggtgg tgcgtaacgg caaaagcacc gccggacatc
      cagggaggac aagtcgatga ctgccccacc acgcattgcc gttttcgtgg cggcctgtag
      >.....Ins A.....>
      c p s c s a t d g v v r n g k s t a g h

4861  agcgctatct ctgctctcac tgccgtaaaa catggcaact gcagttcact tacaccgctt
      tcgcgataga gacgagagtg acggcatttt gtaccgttga cgtcaagtga atgtggcgaa
      >.....Ins A.....>
      q r y l c s h c r k t w q l q f t y t a

4921  ctcaaccggg tacgcaccag aaaatcattg atatggccat gaatggcggt ggatgccggg
      gagttggggc atgcgtgggtc ttttagtaac tataccggta cttaccgcaa cctacggccc
      >.....Ins A.....>
      s q p g t h q k i i d m a m n g v g c r

4981  caaccgcccg cattatgggc gttggcctca acacgatttt ccgccattta aaaaactcag
      gttggcgggc gtaatacccg caaccggagt tgtgctaaaa ggcggtaaat tttttgagtc
      >.....Ins A.....>
      a t a r i m g v g l n t i f r h l k n s

5041  gccgcagtcg gtaacctcgc gcatacagcc gggcagtgac gtcatcgtct gcgcggaaat
      cggcgctcagc cattggagcg cgtatgtcgg cccgctcactg cagtagcaga cgcgccttta
      >....Ins A...>>
      g r s r -

5101  ggacgaacag tggggatacg tgggggctaa atcgcgccag cgctggctgt tttacgcgta
      cctgcttggtc acccctatgc agccccgatt tagcgcgggtc gcgaccgaca aaatgcgcat

5161  tgacaggctc cggaagacgg ttggtgcgca cgtattcggg gaacgcacta tggcgacgct
      actgtccgag gccttctgcc aacaacgcgt gcataagcca cttgcgtgat accgctgcga

5221  gggggcgtct atgagcctgc tgtcaccctt tgacgtgggtg atatggatga cggatggctg
      ccccgagaa tactcggacg acagtgggaa actgcaccac tatacctact gcctaccgac

5281  gggggcgttg ggcagctagc gctcgtcaga aaagtgtcga agatttatgt gctttaatca
      ccccggaac ccgtcgatcg cgagcagtc tttcacagct tctaaatata cgaaattagt

5341  gacgatattt taaagaatca gaaaataaat ttatcaatca tgcttggtgaa aactgataa
      ctgctataaaa atttcttagt cttttattta aatagttagt acgaaccgtt tgtgactatt

5401  gaactctact taataactca agaacagaac aaccaaatta tgattttaaa cagggaggtg
      cttgagatga attattgagt tcttgtcttg ttggtttaaat actaaaattt gtccctccac

5461  atgctgccaa cttactgatt tagtgtatga tgggtgtttt gaggtgctcc agtggcttct
      tacgacgggt gaatgactaa atcacatact accacaaaaa ctccacgagg tcaccgaaga

5521  gtttctatca gctgtccctc ctgttcagct actgacgggg tgggtgcgtaa cggcaaaagc
      caaagatagt cgacagggag gacaagtcga tgactgcccc accacgcatt gccgttttcg

5581  accgcccggc atcagcgcta tctctgctct cactgccgta aaacatggca actgcagttc
      tggcggcctg tagtcgcgat agagacgaga gtgacggcat tttgtaccgt tgacgtcaag

```

```

5641  acttacaccg cttctcaacc cggtagcgac cagaaaaatca ttgatatggc catgaatggc
      tgaatgtggc gaagagttgg gccatgcgtg gtcttttagt aactataaccg gtacttaccg

5701  gttggatgcc gggcaaccgc ccgcattatg ggcgttggcc tcaacacgat tttccgccat
      caacctacgg cccgttggcg ggcgtaatac ccgcaaccgg agttgtgcta aaaggcggta
      >>.....InsB.....>
          m p g n r p h y g r w p q h d f p p

5761  ttaaaaaact caggccgcag tcggtaacct cgcgcatata gccgggcagt gacgtcatcg
      aatTTTTTga gtccggcgct agccattgga gcgcgtatgt cggcccgtca ctgcagtagc
      >.....InsB.....>
          f k k l r p q s v t s r i q p g s d v i

5821  tctgcgcgga aatggacgaa cagtggggat acgtcggggc taaatcgcg cagcgctggc
      agacgcgcct ttacctgctt gtcaccccta tgcagccccg atttagcgcg gtcgcgaccg
      >.....InsB.....>
          v c a e m d e q w g y v g a k s r q r w

5881  tgttttacgc gtatgacagg ctccggaaga cggttgttgc gcacgtattc ggtgaacgca
      acaaaatgcg catactgtcc gaggccttct gccacaacg cgtgcataag ccacttgctg
      >.....InsB.....>
          l f y a y d r l r k t v v a h v f g e r

5941  ctatggcgac gctggggcgt cttatgagcc tgctgtcacc ctttgacgtg gtgatatgga
      gataccgctg cgaccccgca gaatactcgg acgacagtgg gaaactgcac cactatacct
      >.....InsB.....>
          t m a t l g r l m s l l s p f d v v i w

6001  tgacggatgg ctggccgctg tatgaatccc gcctgaaggg aaagctgcac gtaatcagca
      actgcctacc gaccggcgac atacttaggg cggacttccc tttcgacgtg cattagtctg
      >.....InsB.....>
          m t d g w p l y e s r l k g k l h v i s

6061  agcgatatac gcagcgaatt gagcggcata acctgaatct gaggcagcac ctggcacggc
      tcgctatatg cgtcgcttaa ctgcgcgtat tggacttaga ctccgctcgtg gaccgtgccg
      >.....InsB.....>
          k r y t q r i e r h n l n l r q h l a r

6121  tgggacggaa gtcgctgtcg ttctcaaaat cggtaggagct gcatgacaaa gtcacggggc
      accctgcctt cagcgacagc aagagtttta gccacctcga cgtactgttt cagtagcccc
      >.....InsB.....>
          l g r k s l s f s k s v e l h d k v i g

6181  attatctgaa cataaaacac tatcaataag ttggagtcac taccgtcatc catgaatcag
      taatagactt gtattttgtg atagttattc aacctcagta atggcagtag gtacttagtc
      >.....InsB.....>>
          h y l n i k h y q -

6241  cttttgaggg cgggaaaaag gataacgata aagaatggaa actgaaagtgg tcggagcgcg
      gaaaactccg gccctttttc ctattgctat ttcttacctt tgacttcacc agcctcgcgc

6301  acaaggccga taaagaagcg caattgacac aggaacaagc gcagcgtgaa gaagaactcc
      tgttccggct atttcttcgc gttaactgtg tccttggttcg cgtcgcactt cttcttgagg

6361  ggcgtaagaa gaaaacagag gaaattgtaa atgatgcaga acgggaaaaa caaaaggcac
      ccgcattctt cttttgtctc cttaacatt tactacgtct tgcccttttt gttttccgtg

6421  tggtgatgac tgttgacgct gataatgctg ctgaccagtt gcgcggggcaa ctcgccaaaa
      accgactacg acaactgcga ctattacgac gactgggtcaa cgcgcccgtt gagcggtttt

6481  tcaggcggtg actcgcaacc agtgaaacag gcaggatttc cgcagatgcc gccagaaggc
      agtcgcgact tgagcggttg tcactttgtc cgtcctaaag gcgtctacgg cggctctccg

6541  agacagccgc cgagaccgca agtttgcttg ccgacctgta cgaagaatca gaccgtcgtg
      tctgtcggcg gctctggcgt tcaaacgaac ggctggacat gcttcttagt ctggcagcac

```

BsaI

```

6601  cgggagaaat cgctaaatat gctgacgcag cagccagtgc cggtagcgtc tgcgaacgca
      gccctcttta gcgatttata cgactgcgtc gtcggtcacg gccatcgcag acgcttgcgt

6661  catatgacgc ggtaacgcga tctgttgagt gatcgaaacg gatcaattaa tgcccgtatg
      gtatactgcg ccattgcgct agacaactca ctagctttgc ctagttaatt acgggcatac

6721  tgattgataa tttggatggt tgaatgaaaa gggcggggat gtgatgtgga ttgcttgttt
      actaactatt aaacctacca acttactttt cccgccccta cactacacct aacgaacaaa

6781  gtagttgatt tttaaactga ctacggatac gctttaaggc acggagaaca agggttttct
      catcaactaa aaatttgact gatgcctatg cgaaattccg tgcctcttgt tcccaaaaga

6841  gagattaacg cgcataacaa gcggtttact cgttttggcc tgcaatgtaa cataatatac
      ctctaattgc gcgtattggt cgccaaatga gcaaaaccgg acgttacatt gtatttatgt

      FspAI                               BclI
6901  attatgcgca ctaaggtaga ggcagcaaga ttatgcggtt ttgatcagaa ctcagttaac
      taatacgcgt gattccatct ccgtcgttct aatacgccaa aactagtcct gagtcaattg

6961  catcccggga ttctgctctg gccatttcag cgcagttttt tactttggat gaagttaacc
      gtagggccct aagacgagac cgggtaagtc gcgtcaaaaa atgaaacctt cttcaattgg

7021  catgttatat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac aataaaactg tctgcttaca
      gtacaatata acgtgttcta tttttatata gtagtacttg ttattttgac agacgaatgt

7081  taaacagtaa tacaaggggt gttatgagcc atattcaacg ggaaacgtct tgctcgaggc
      atttgtcatt atgttcccc caatactcgg tataagttgc cttttgcaga acgagctccg
      >>.....AphA1.....>
      m s h i q r e t s c s r

7141  cgcgattaa ttccaacctg gatgctgatt tatatgggta tagatgggct cgcgataatg
      gcgctaattt aaggttggac ctacgactaa atatacccat atctaccga gcgctattac
      >.....AphA1.....>
      p r l n s n l d a d l y g y r w a r d n

7201  tcgggcaatc aggtgcgaca atctatcgat tgtatgggaa gcccaatgcg ccagagttgt
      agcccgtagg tccacgctgt tagatagcta acataccctt cgggttacgc ggtctcaaca
      >.....AphA1.....>
      v g q s g a t i y r l y g k p n a p e l

7261  ttctgaaaca tggcaaaggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa
      aagactttgt accgtttcca tcgcaacggt tactacaatg tctactctac cagtctgatt
      >.....AphA1.....>
      f l k h g k g s v a n d v t d e m v r l

7321  actggctgac ggcatttatg cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg
      tgaccgactg ccgtaaatac ggagaaggct ggtagtctgt aaaataggca tgaggactac
      >.....AphA1.....>
      n w l t a f m p l p t i k h f i r t p d

7381  atgcatgggt actcaccact gcgatccccg ggaaaacagc attccaggta ttagaagaat
      tacgtaccaaa tgagtgggtga cgtaggggc ccttttgtcg taaggtccat aatcttctta
      >.....AphA1.....>
      d a w l l t t a i p g k t a f q v l e e

7441  atcctgattc aggtgaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatc
      taggactaag tccactttta taacaactac gcgaccgtca caaggacgcg gccaacgtaa
      >.....AphA1.....>
      y p d s g e n i v d a l a v f l r r l h

7501  cgattcctgt ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc
      gctaaggaca aacattaaca ggaaaattgt cgctagcgca taaagcagag cgagtccgcg
      >.....AphA1.....>
      s i p v c n c p f n s d r v f r l a q a

```

```

7561 aatcacgaat gaataacggt ttggttgatg ctagtgattt tgatgacgag cgtaatggct
      ttagtgctta cttattgcc aaccaactac gatcactaaa actactgctc gcattaccga
      >.....AphA1.....>
      q s r m n n g l v d a s d f d d e r n g

7621 ggcctgttga acaagtctgg aaagaaatgc ataagctttt gccattctca ccggattcag
      ccggacaact tgttcagacc tttctttacg tattcgaaaa cggtaaagagt ggcctaagtc
      >.....AphA1.....>
      w p v e q v w k e m h k l l p f s p d s

7681 tcgtcactca tggtgatttc tcaattgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag
      agcagtgagt accactaaag agtgaactat tggaataaaa actgctcccc ttttaattatc
      >.....AphA1.....>
      v v t h g d f s l d n l i f d e g k l i

7741 gttgtattga tgttggacga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat
      caacataact acaacctgct cagccttagc gtctggctat ggtcctagaa cggtaggata
      >.....AphA1.....>
      g c i d v g r v g i a d r y q d l a i l

7801 ggaactgcct cggtagagttt tctccttcat tacagaaaacg gctttttcaa aaatatggta
      ccttgacgga gccactcaaa agaggaagta atgtctttgc cgaaaaagtt tttataccat
      >.....AphA1.....>
      w n c l g e f s p s l q k r l f q k y g

7861 ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctgat
      aactattagg actatactta tttaacgtca aagtaaacta cgagctactc aaaaagacta
      >.....AphA1.....>>
      i d n p d m n k l q f h l m l d e f f -

7921 attttcgcta aaagcccttg tagtgctctt tactcaggcc atatttcttc attctgagat
      taaaagcgat tttcggaac atcacgagaa atgagtccgg tataaagaag taagactcta
      <<.....pgtA.....<
      - f g k y h e k s l g y k k m r l

7981 agagtttttt acgcggaata agcagatact ccgctacttc attaatgcgc ccctgatgga
      tctcaaaaaa tgcgccttat tcgtctatga ggcgatgaag taattacgcg gggactacct
      <.....pgtA.....<
      y l k k r p i l l y e a v e n i r g q h

8041 gattcagcgc ttcggtgatg atctgccgct ctacgtcctc aaccgcgcga tcgagcggcg
      ctaagtcgcg aagccactac tagacggcga gatgcaggag ttgggcagct agctcgcgcg
      <.....pgtA.....<
      l n l a e t i i q r e v d e v r r d l p

8101 tcggctcgcc gacgtgcac agcggattca ccgtatccgc gagcggtaat acccccaccg
      agccgagcgg ctgcacgtag tcgcctaagt ggcataggcg ctgcgccatta tgggggtggc
      <.....pgtA.....<
      t p e g v h m l p n v t d a l p l v g v

8161 catacagttc ggcagcgttc gccagttcgc ggacgttggt cggccacgcc cgacgtatca
      gtatgtcaag ccgtcgcaag cggcgaagcg cctgcaacaa gccggtgcgg gctgcatagt
      <.....pgtA.....<
      a y l e a a n a l e r v n n p w a r r i

8221 tcccttttaa cagatggcta tccacctccg ggacgggatg attcagccgc tgacaggttt
      agggaaaatt gtctaccgat aggtggaggc cctgccctac taagtcggcg actgtccaaa
      <.....pgtA.....<
      m g k l l h s d v e p v p h n l r q c t

8281 tttgcaaata gtgggtggaac agcggctcga tatcatcagg ccgccttgac agcggcaggc
      aaacgtttat caccaccttg tcgccgagct atagtagtcc ggcggaactg tcgccgtccg
      <.....pgtA.....<
      k q l y h h f l p e i d d p r r s l p l

```

```

8341  aggcaatttg cgtcgctcgc aagcagtaat agagttccgc cacgatctgg ctactgcccc
      tccgttaaag gcagcagcgc ttcgtcatta tctcaaggcg gtgctagacc gatgacgggg
      <.....pgtA.....>
      c a i q t t a f c y y l e a v i q s s g

8401  ccagcgccac tagcgacgcg ctgccgatac caatcaggcg aaaaggccgt ttctcatggc
      ggtcgcggtg atcgctgcgc gacggctatg gttagtccgc ttttccggca aagagtaccg
      <.....pgtA.....>
      a l a v l s a s g i g i l r f p r k e h

8461  tctgcgcctg taccagcaga tgttgttgct catgagtcag gtgctccggg tggcttaata
      agacgcggac atggctgtct acaacaacga gtactcagtc cacgaggccc accgaattat
      <.....pgtA.....>
      s q a q v l l h q q e h t l h e p h s l

8521  ccagcgttcc gccctgcgcc tgcgcgatcg cgctattcag cttatgggcg ttggccgcag
      ggtcgcaagg cgggacgcgg acgcgctagc gcagtaagtc gaatacccg c aaccggcgctc
      <.....pgtA.....>
      v l t g g q a q a i a d n l k h a n a a

8581  tcagttcgca gtagacaaaa gggccttcgg cgttacgccc cagctgggtg aggtaacgtg
      agtcaagcgt catctgtttt cccggaagcc gcaatgcggg gtcgaccacg tccattgcac
      <.....pgtA.....>
      t l e c y v f p g e a n r g l q h l y r

8641  cgccggtcat acgcccgggt cccgcttcgc cgtaaagcca gaccgcaata tccgtctctg
      gcggccagta tgcgggcca a gggcgaagcg gcatttcggt ctggcgttat aggcagagac
      <.....pgtA.....>
      a g t m r g t g a e g y l w v a i d t e

8701  ccagctgctg taaacgctgg cgatactgtt ccgtccattg gctgcgccc atcagctcaa
      ggtcgacgac atttgcgacc gctatgacaa ggcaggtaac cgacgcgggc tagtcgagtt
      <.....pgtA.....>
      a l q q l r q r y q e t w q s r g i l e

8761  cccgtaattt ttgctggccg tactggcgac gcgcgatcac cgcttgccgc tggcgcaacg
      gggcattaaa aacgaccggc atgaccgctg cgcgctagtg gcgaacggcg accgcgttgc
      <.....pgtA.....>
      v r l k q q g y q r r a i v a q r q r l

8821  cggcgctccac cagcgagagc agctttcccg gatcaaccgg cttttgcaga aaatcccagg
      gccgcaggtg gtcgctctcg tcgaaaggcg ctagtggcc gaaaacgtct ttaggggtcc
      <.....pgtA.....>
      a a d v l s l l k g p d v p k q l f d w

8881  cccctttttt caccgcatcc accgccatcg gtacgtcgcc atgaccggtg ataagcagaa
      gggggaaaaa gtggcgtagg tggcggtagc catgcagcgg tactggccac tattcgtctt
      <.....pgtA.....>
      a g k k v a d v a m p v d g h g t i l l

8941  tcggcagctg ctcgctcatc tgatgaaaca gcgtcatcaa atcgatgccg gagcagccgg
      agccgtcgac gagcagtagg actactttgt cgcagtagtt tagctacggc ctcgctcggc
      <.....pgtA.....>
      i p l q e d d q h f l t m l d i g s c g

9001  gcatgcagac atcgctcagc acaatgccgg gccagtcctt ctgcacccac gcccgcgcat
      cgtacgtctg tagcgagtcg tgttacggcc cggtcaggaa gacgtgggtg cgggcgcgta
      <.....pgtA.....>
      p m c v d s l v i g p w d k q v w a r a

9061  caaagggggt atcgcaggcg tggacgtgat aaccgcgttg ctcaagcagc tgcgtatagg
      gtttcccaa tagcgccgc acctgcacta ttgggcgaac gagttcgtcg acgcatatcc
      <.....pgtA.....>
      d f p n d c a h v h y g a q e l l q t y

```

```

9121  catccagcac gtcgcgatca tcatcaatca gcagaatcga acactcatta ctcaacatca
      gtaggtcgtg cagcgctagt agtagttagt cgtcttagct tgtgagtaat gagttgtagt
      <.....pgtA.....>
      a d l v d r d d d i l l i s c e n s l m

9181  tttacatccg ttaaattgaa ttgcagcacc acgcaggcat tgcgcgttaa cgtcgacgcc
      aaatgtaggc aatttaactt aacgtcgtgg tgcgtccgta acgcgcaatt gcagctgcgg
      < pgtA
      m

9241  aggcgcagcg tcccttccat ttgcgtcatc agcgaaacag aaatcgacag cccaatcccc
      tccgcgtcgc aggggaaggta aacgcagtag tcgctttgtc tttagctgtc gggttagggg

9301  agccccacat ctttgctggg ggtgaacggc ttcagcagtg acggtagcaa ggccgcaggc
      tcggggtgta gaaacgacca ccacttgccg aagtcgtcac tgccatcgtt ccggcgtccg

9361  cagccggggac cgttatcggc aatcaacacg cacaggggtg cgccgtggat ttgccagctc
      gtcggccctg gcaatagccg ttagttgtgc gtgtcccaca gcggcaccta aacggtcgag

9421  accgttatatt tgcgcgcgtt cggacaggcg tcgagcgcac tcgacagtac gttgaccagc
      tggcaataaaa agcggcgcaa gcctgtccgc agctcgcgta agctgtcatg caactggtcg

9481  acctgatgaa cccgcacttc atcgccgcag atcccgtgct gcctgtcctt cagaacgaag
      tggactactt gggcgtgaag tagcggcgtc tagggcacga cggacaggaa gtcttgcttc

9541  ccagacaaca aaaacgtggg ctctggtcag atgctgatcc gggtcccccc tggatatgga
      ggtctgttgt ttttgcaccc gagaccagtc tacgactagg ccaagggggg acctatacct

9601  gacaccgtaa ataaagcgat ggcaatctta tcattcatct gttctcagcg ggaataaaaa
      ctgtggcatt tatttcgcta ccgttagaat agtaagtaga caagagtcgc ccttattttt

9661  tggcgaaaaac aaaacaggaa tggctgtatc agttacggcg atgttcatca gtcaatacgc
      accgcttttg ttttgcctt accgacatag tcaatgccgc tacaagtagt cagttatgcy

9721  tggaaaaaat tattcataaa aacagagaca gtttattaaa cagtgaacgt gaatcattta
      acctttttta ataagtattt ttgtctctgt caaataattt gtcacttgca cttagtaaat

9781  attcagcagc agaccaccgg ttagcggaat taatcaccgg aaagttatat gacaggatac
      taagtcgtcg tctggtggcc aatcgccctta attagtggcc tttcaatata ctgtcctatg

9841  caaaagagat atggaaatat gtaaggtaat aattcagcat aattaattac caggagcaga
      gttttctcta tacctttata cattccatta ttaagtcgta ttaattaatg gtccctcgtct

9901  taaacaatga agctgattat ttttattctt attgttctga ttattgcagc gttactttatc
      atttgttact tcgactaata aaaataagaa taacaagact aataacgtcg caatgaatag
      >>.....ORF-2.....>
      m k l i i f i l i v l i i a a l l i

9961  cggattatcc tcagaagtggt aaatcagcat tctcctttgc tgatgcaatt gcatgcggca
      gcctaataagg agtcttcaca tttagtcgta agaggaaacg actacgttaa cgtacgccgt
      >.....ORF-2.....>
      r i i l r s v n q h s p l l m q l h a a

          RsrII
          |
10021  ggtatacggg ccggtgatgc agagcgaata ctgtccggcg gtgaatactg gcaacgtcag
      ccatatgcct ggccactacg tctcgtttat gacaggccgc cacttatgac cgttgcagtc
      >.....ORF-2.....>
      g i r t g d a e r i l s g g e y w q r q

10081  aagacgctgc tgacagaaag ggaagtcagt tttatgaaag gactgttcag aattgtggat
      ttctgcagcg actgtctttc cttcagtcga aaatactttc ctgacaagtc ttaacaccta
      >.....ORF-2.....>
      k t l l t e r e v s f m k g l f r i v d

10141  atgaagcggg ggtatctgtg tccgcaggta cgggtcgcag atatcgtcca gctgaacggg
      tacttcgcca ccatagacac aggcgtccat gccagcgtc tatagcaggt cgacttgccc
      >.....ORF-2.....>
      m k r w y l c p q v r v a d i v q l n g

```

```

10201 aatatccggc cacgatcacg ccagtggtgg cagttattca ggatggtgtc tcagtggcat
      ttataggccg gtgctagtgc ggtcaccacc gtcaataagt cctaccacag agtcaccgta
      >.....ORF-2.....>
      n i r p r s r q w w q l f r m v s q w h

10261 gttgatgtgg ttatcgttga gcggcgttcg ttcagtattg ttgcagcagt agagctggat
      caactacacc aatagcaact cgccgcaagc aagtcataac aacgtcgtca tctcgacct
      >.....ORF-2.....>
      v d v v i v e r r s f s i v a a v e l d

10321 gatgccagcc atttacgacc tgaacgcaga cgccgggata ttcttctgga agaggttctg
      ctacggtcgg taaatgctgg acttgcgtct gcggccctat aagaagacct tctccaagac
      >.....ORF-2.....>
      d a s h l r p e r r r r d i l l e e v l

10381 aggcaggctg gtattccgtt gctcagaagc cacgatgcca gaaaactgct gcagatgacc
      tccgtccgac cataaggcaa cgagtcttcg gtgctacggt cttttgacga cgtctactgg
      >.....ORF-2.....>
      r q a g i p l l r s h d a r k l l q m t

10441 ggagaatggc tgaatacaac aggggctgcc cagcagtcac cggaacatcg tagctgacgc
      cctcttaccg acttatgttg tccccgacgg gtcgtcagtg gccttgtagc atcgactgcg
      >.....ORF-2.....>>
      g e w l n t t g a a q q s p e h r s -

10501 cttcgcgttg ctcagttgtc caaccccgga aacgggaaaa agcaagtttt ccccgctccc
      gaagcgcaac gagtcaacag gttggggcct ttgccctttt tcgttcaaaa ggggcgaggg

10561 ggcgtttcca taactgaaaa ccatactatt tcacagttta aatcacatta aacgacagta
      ccgcaaaggt attgactttt ggtatgataa agtgtcaaat ttagtgtaat ttgctgtcat

10621 atccccgttg atttgtgctc caacacagat cttcgtcaca attctcaagt cgctgatttc
      taggggcaac taaacacgcy gttgtgtcta gaagcagtggt taagagttca gcgactaaa

10681 aaaaaactgt agtatcctct gcgaaacgat ccctgtttga gtattgagga ggcgagatgt
      ttttttgaca tcataggaga cgctttgcta gggacaaaact cataactcct ccgctctaca
      copB >>.>
      m

10741 cgcagacaga aaatgcagtg acttccctcat tgagtcaaaa gcggtttgtg cgcagaggta
      gcgtctgtct tttaactcac tgaaggagta actcagtttt cgccaaacac gcgtctccat
      >.....copB.....>
      s q t e n a v t s s l s q k r f v r r g

10801 agcctatgac tgactctgag aaacaaatgg ccgctgttgc aagaaaaacgt cttacacaca
      tcggatactg actgagactc tttgtttacc ggcgacaacg ttcttttgca gaatgtgtgt
      >.....copB.....>
      k p m t d s e k q m a a v a r k r l t h

10861 aagagataaa agtttttgtc aaaaatcctc tgaaagatct catggttgag tactgcgaga
      ttctctattt tcaaaaacag tttttaggag actttctaga gtaccaactc atgacgctct
      >.....copB.....>
      k e i k v f v k n p l k d l m v e y c e

10921 gagaggggat aacacaggct cagttcgttg agaaaatcat caaagatgaa ctgcagagac
      ctctccccta ttgtgtccga gtcaagcaac tcttttagta gtttctactt gacgtctctg
      >.....copB.....>
      r e g i t q a q f v e k i i k d e l q r

10981 tggatatact aaagtaaaga ctttactttg tggcgtagca tgctagatta ctgatcgttt
      acctatatga tttcatttct gaaatgaaac accgcacgtg acgatctaata gactagcaaa
      >.....copB.....>>
      l d i l k -

<<.....CopA.....<
      - i v s r k

```

```
11041 aaggaatattt gtggctggcc acgccgtaag gtggcaagga actggttctg atgtggattt
      ttccttaaaa caccgaccgg tgcggcattc caccgttcct tgaccaagac tacacctaaa
                                     >>.tap...>
                                     m w i
      <.....CopA.....<
      l f k t a p w a t l h c p v p e s t s k

11101 acaggagcca gaaaagcaaa aaccccgata atcttcttca actttggcga gtacgaaaag
      tgtcctcggg cttttcgttt ttggggctat tagaagaagt tgaaaccgct catgcttttc
      >.....tap.....>
      y r s q k s k n p d n l l q l w r v r k
      <.....CopA.....<
      c s g s f c f g r y d e e v k a l v f l

11161 attaccgggg ccacttaaa ccgtatagcc aacaattcag ctatgcgggg agtatagtta
      taatggcccc ggggtgaattt ggcataatcg ttgttaagtc gatacgcgcc tcatatcaat
      >.....tap.....>
      d y r g p l k p y s q q f s y a g s i v
      <.....CopA.....<<
      n g p g v

11221 tatgcccgga aaagttcaag acttctttct gtgctcgctc cttctgc
      atacgggcct tttcaagttc tgaagaaaga cacgagcgag gaagacg
      >.....tap.....>
      i c p e k f k t s f c a r s f c
```


A.- ANEXO 2.



Kis antitoxin couples plasmid R1 replication and *parD* (*kis*, *kid*) maintenance modules

Juan López-Villarejo, Elizabeth Diago-Navarro, Ana María Hernández-Arriaga, Ramón Díaz-Orejas^{*}

Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Dept. de Microbiología Molecular y Biología de la Infección, C/Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2011

Accepted 29 December 2011

Available online 8 January 2012

Communicated by Manuel Espinosa

Keywords:

R1 plasmid

Replication maintenance systems

Toxin–antitoxin systems

Replication mutants

ABSTRACT

The coupling between the replication and *parD* (*kis*, *kid*) maintenance modules of R1 has been revisited here by the isolation of a significant collection of conditional replication mutants in the pKN1562 mini-R1 plasmid, and in its derivative, pJLV01, specifically affected in the RNase activity of the Kid toxin. This new analysis aims to identify key factors in this coupling. For this purpose we have quantified and characterized the restriction introduced by *parD* to isolate conditional replication mutants of this plasmid, a signature of the modular coupling. This restriction depends on the RNase activity of the Kid toxin and it is relieved by either over-expression of the Kis antitoxin or by preventing its degradation by Lon and ClpAP proteases. Based on these data and on the correlation between copy numbers and *parD* transcriptional levels obtained in the different mutants, it is proposed that a reduction of Kis antitoxin levels in response to inefficient plasmid replication is the key factor for coupling plasmid replication and *parD* modules.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Work in K. Nordström laboratory on the antibiotic resistance factor R1 provided pioneering information on plasmid replication and its control (Nordström, 2006; Nordström et al., 1984). The frequency of replication initiation of this plasmid depends on the levels of the RepA initiator protein. These levels are controlled by the genes controlling plasmid copy number, *copA* and *copB*. CopA is an unstable antisense RNA that is transcribed from a constitutive promoter and that hybridizes with the CopT region within the messenger of RepA inhibiting the synthesis of RepA at the post-transcriptional level; due to its unstable character, CopA senses the plasmid gene dosage and can act as the main copy number controller correcting fluctuations in the frequency of plasmid replication initiation (Nordström and Wagner, 1994; Nordström et al., 1984; Nordström, 2006) (Fig. 1A). CopB is a multimeric

protein and an auxiliary copy number controller that represses transcription of *repA* from the efficient *PrepA* promoter located between *copB* and *repA* genes. In the presence of this repressor the *repA* messenger is made as a polycistronic *copB–repA* mRNA transcribed from the constitutive promoter of *copB*. In low copy number situations the level of CopB decreases, the multimeric CopB protein dissociates and this inactivates the repressor and activates the *PrepA* promoter that increases the levels of RepA and the efficiency of plasmid replication. In this way CopB contributes to rescue inefficient plasmid replication (Light et al., 1985; Olsson et al., 2004; Riise and Molin, 1986). Plasmid R1 replication is initiated due to specific interactions of RepA at *oriR1*, the single origin of replication of this plasmid, and it proceeds in an unidirectional way to terminus by a theta-type mechanism; *in vitro* replication of plasmid R1 is also dependent on DnaA, the replication initiation protein of the host, that interacts at the *dnaA* box guided by interactions with the RepA protein (Diaz and Staudenbauer, 1982; Giraldo and Diaz, 1992; Ortega et al., 1986). Studies on plasmid R1 further contributed to

^{*} Corresponding author. Fax: +34 918373112.

E-mail address: ramondiaz@cib.csic.es (R. Díaz-Orejas).

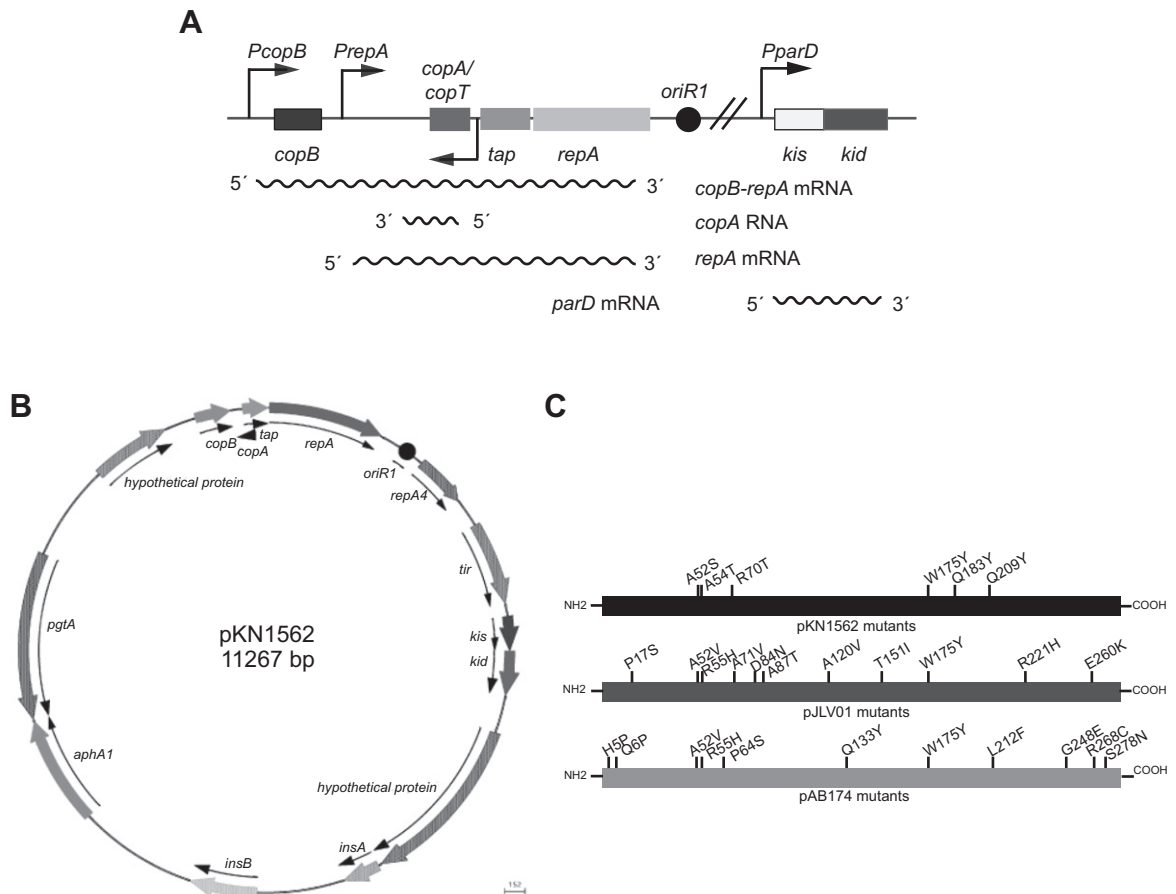


Fig. 1. Relevant plasmid R1 regions analyzed in this work. (A) Replication and *parD* regions of plasmid R1. This region contains the basic replicon which includes the origin of replication (*oriR1*), the gene of the replication initiation protein (*repA*), the gene of the translation adaptor protein (*tap*) needed for efficient RepA translation, the copy number control genes (*copA*, *copB*); it is also shown as waved lines the relevant transcripts in the region and the adjacent toxin–antitoxin *parD* system (*kis*, *kid*). Black arrows indicate promoter regions. (B) Location of relevant genes in the map of the R1-derivative plasmid, pKN1562, used in this work. *aphA1* is the gene coding resistance to kanamycin; *repA*, *oriR1*, *copA* and *copB* and *parD* T–A system are shown. (C) Amino acid changes corresponding to *repA* mutations isolated in three different mini-R1 plasmids: pKN1562 (*parD* wild type), pJLV01 (*parD*-*kidD75E*) and pAB174 (*parD*- Δ *kidKis*). The size and map of pKN1562 were determined sequencing one DNA chain of the plasmid.

identify and characterize the mechanisms and functions of three auxiliary and dispensable R1 maintenance systems: *parA*, a plasmid partitioning system (Gerdes et al., 2004), *hok-sok*, a type I toxin–antitoxin (TA) system (Gerdes and Wagner, 2007) and *parD* or *kis-kid*, a type II TA system (Diago-Navarro et al., 2010).

parD is an autoregulated operon of two genes coding two small proteins, an antitoxin, Kis (killer suppressor) and a toxin, Kid (killing determinant), that is located close to the basic replicon of the plasmid. This system was discovered in pKN1562, a mini-R1 derivative coding resistance to kanamycin and devoid of the partitioning and type I TA system of plasmid R1. The discovery was due to the isolation of *kis17*, a mutation in the gene of Kis antitoxin that deregulated the *parD* system and partially activated the Kid toxin. The mutation increased more than two orders of magnitude the stability of the plasmid without substantially increasing its copy number (Bravo et al.,

1987). Kis antitoxin, in addition to neutralize Kid toxin, plays the key role in transcriptional regulation of the system. Kid toxin also is involved in transcriptional regulation of the *parD* system: it forms with the Kis antitoxin a hetero-octameric complex that binds efficiently to the promoter operator region of *parD* (Monti et al., 2007).

Initial studies indicated that the *parD* system restricted the isolation of conditional replication mutants of the plasmid. Indeed, a deletion that removed the toxin and part of the antitoxin genes of this system (pAB174 plasmid) allowed the ready isolation of *repts* mutants, one of which was localized in *repA* gene, the gene of the plasmid initiator protein (Ortega et al., 1989). Later on, it was found that this system is de-regulated and its toxin is activated when the efficiency of plasmid replication decreased, implying that there is a functional coupling between the basic replicon of the plasmid and this auxiliary maintenance module (Ruiz-Echevarria et al., 1995).

An unexpected result of this coupling was the observation that the *parD* system contributed to the recovery of the inefficient plasmid replication (Ruiz-Echevarria et al., 1995). This effect remained a riddle until the identification of the RNase activity of the Kid toxin and the definition of its target. Kid cleaves RNA at the core sequence 5'-UA(C/A)-3' preferentially in single stranded regions (Diago-Navarro et al., 2009; Muñoz-Gomez et al., 2005; Zhang et al., 2004). RNA cleavage is much more efficient when U are flanking this core (Diago-Navarro et al., 2009; Kamphuis et al., 2006; Pimentel et al., 2005). It was found that the polycistronic *copB-repA* mRNA contained a single preferential cleavage site for Kid, 5'-UUACU-3', at the intergenic *copB-copA* region. Cleavage at this site by Kid leads to the activation of the internal *PrepA* promoter that is repressed by CopB thus increasing transcription levels of RepA. It was proposed that the cleavage of the *copB-repA* mRNA by Kid reduced the levels of the CopB repressor, probably as a consequence of a fast degradation of the processed messenger (Pimentel et al., 2005). The increase in RepA expression levels induced by Kid suggested an explanation for the observed recovery in the efficiency of replication in the presence of *parD* and it implied that Kid was modulating the replication-rescue role of the CopB protein.

The analysis presented in this manuscript address the identification of key elements involved in the coupling between R1 replication and *parD* modules. The results suggest that a reduction of the Kis antitoxin levels in response to inefficient plasmid replication is a key factor in this coupling.

Interestingly a functional coupling between conjugative functions of R1 and the basic replicon of this plasmid, based on the invasion of this region by transcripts initiated beyond *finO*, has been reported recently (Nuk et al., 2011a,b).

2. Material and methods

2.1. Cell cultures, strains and plasmids

L-Broth (LB) and L-Broth agar (LA) were used as culture mediums (Maniatis et al., 1982). As required, kanamycin was supplemented at a concentration of 50 µg/ml. The *Escherichia coli* strains OV2 (Donachie et al., 1976), MG1655 (Bachmann, 1987), a MG1655 variant containing deletions of *lon* and *clpP* genes (kind gift of L. van Melder) and MC1061 (Casadaban and Cohen, 1980) were used as plasmid hosts in the experiments. Note that due to the fact that OV2 carries the *supFts* mutation, it introduces, at the permissive temperature, a tyrosine at amber termination codons (see Table 1). pKN1562 is a wild-type (wt) mini-R1 plasmid conferring resistance to kanamycin and carrying the wt *parD* system (Molin et al., 1979). pAB74 is a pKN1562 derivative bearing a deletion that inactivates the *parD* system (Bravo et al., 1987). Plasmid pJLV01 was obtained in this work by site-directed mutagenesis of pKN1562; it carries the point mutation *kidD75E* that inactivates the RNase function of the Kid toxin but not its co-regulatory activity (Diago-Navarro et al., 2009). pMLM126, an overproducer of Kis antitoxin, has been

previously described (Lemonnier et al., 2004). Table 1 details additional plasmids used in this work.

2.2. Plasmid preparation, hydroxylamine mutagenesis, site-directed mutagenesis and DNA sequencing determinations

Plasmid DNA extractions and transformations were essentially as described (Sambrook et al., 1989). *In vitro* mutagenesis of plasmids was done with hydroxylamine, a mutagen that induces GC-AT transitions due to the hydroxylation of cytosines; the mutagenic treatment was carried out for 35 min at 65 °C as previously described (Hashimoto and Sekiguchi, 1976). This DNA was extensively dialyzed against TE buffer (Tris-HCl 10 mM, pH. 8.0, 1 mM EDTA) and used to transform the selected *E. coli* strains. Site directed mutagenesis was done as required, with the Quik-Change® XL II-Site-Directed mutagenesis kit of Stratagene following the protocols indicated by this manufacturer. DNA sequencing was done basically by the chain terminator method (Sanger et al., 1977) at the DNA sequencing facility of the CIB (SECUGEN S.L.) using an Abi-Prism apparatus (Perkin-Elmer). The oligonucleotides used for site directed mutagenesis and for DNA sequencing are indicated in Table 2.

2.3. Plasmid stability determinations

Colonies of cells-containing plasmids were rescued in LA plates containing kanamycin (50 µg/ml) that were incubated overnight at 30 °C. Twenty colonies growing in these plates were picked and suspended in LB medium without antibiotic and propagated again at 30 °C in LA plates without antibiotic. One-hundred colonies growing in these plates were streaked in plates with and without antibiotic to determine the percentage of plasmid-containing cells. Other twenty colonies were pooled together and propagated in non-selective medium as above. The percentage of plasmid containing cells in colonies growing after this second propagation was determined as above. The standard deviation corresponding to these determinations, were calculated in three independent experiments.

2.4. Relative plasmid copy number determinations by qPCR

R1 mini plasmids copy numbers relative to chromosome were determined by quantitative PCR methodologies (qPCR) as described (Lee et al., 2006). In these determination *kis* and *lpp* genes were selected as plasmid and chromosome markers, respectively (see Table 2). We used primers that amplified the 5'-regions of *kis* or *lpp* genes, giving products of 186 and 140 bp, respectively. The threshold cycle values, C_t , corresponding to the amplification products were detected with SYBR Green. In these experiments OV2 was used as the plasmid recipient host. Cell cultures were grown to an OD₆₀₀ ~0.5 with vigorous shaking at 30 °C in LB medium containing kanamycin; the whole DNAs were extracted, and digested with *EcoRI* for 2 h at 37 °C; this restriction enzyme targets a single site in the mini-R1 plasmids thus linearizing it. The efficiency of the qPCR reaction after this linearization was close to

Table 1

Plasmids and mutants used or characterized in this work.

Plasmids	Parental	Relevant genotype	Aminoacid (codon) change in RepA	References
pKN1562	R1 drd-19	Miniderivate of R1, <i>repA</i> ⁺ , <i>parD</i> ⁺ , <i>aphA1</i> ⁺		Molin et al. (1979)
pAB17	pKN1562	<i>parD</i> (<i>kis18</i> , <i>kid</i> ⁺), <i>aphA1</i> ⁺		Bravo et al. (1987)
pAB174	pAB17	Δ <i>parD</i> , <i>aphA1</i> ⁺		Bravo et al. (1987)
pJLV01	pKN1562	<i>repA</i> ⁺ , <i>parD</i> ⁺ , <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺		This work
pJLV01-R55H	pJLV01	<i>repAR55H</i> , <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺	R55H (CGT-CAT)	This work
pJLV01-D84N-R221H	pJLV01	<i>repAD84N-R221H</i> , <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺	D84N (GAC-AAC) R221H (CGT-GTT)	This work
pJLV01-A52V	pJLV01	<i>repAA52V</i> , <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺	A52V (GCG-GTG)	This work
pJLV01-E260K	pJLV01	<i>repAE260K</i> , <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺	E260K (GAA-AAA)	This work
pJLV01-A71V	pJLV01	<i>repAA71V</i> , <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺	A71V (GCT-GTT)	This work
pJLV01-A120V	pJLV01	<i>repAA120V</i> , <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺	A120V (GCC-GTC)	This work
pJLV01-P17S	pJLV01	<i>repAP17C</i> , <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺	P17S (CCG-TCG)	This work
pJLV01-A87T	pJLV01	<i>repAA87T</i> , <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺	A87T (GCC-ACC)	This work
pJLV01-T151I	pJLV01	<i>repA</i> T151I, <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺	T151I (ACA-ATA)	This work
pJLV01-OriR1	pJLV01	Mutation in the origin of replication, <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺		This work
pJLV01-W175Amber	pJLV01	<i>repAW175Amber</i> , <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺	W175Y (TGG-TAG)	This work
pJLV01-R249C-R264H	pJLV01	<i>repAR249C-R264H</i> , <i>kidD75E</i> , <i>aphA1</i> ⁺	R249C (CGC-TGC) R264H (CGT-CAT)	This work
pAB174-P64S	pAB174	<i>repAP64S</i> Δ <i>parD</i> , <i>aphA1</i> ⁺	P64S (CCA-TCA)	This work
pAB174-R268C	pAB174	<i>repA</i> R268C Δ <i>parD</i> , <i>aphA1</i> ⁺	R268C (CGC-TGC)	This work
pAB174-Q133Amber	pAB174	<i>repAQ133Amber</i> , Δ <i>parD</i> , <i>aphA1</i> ⁺	Q133Y (CAG-TAG)	This work
pAB174-W175Amber-S278N	pAB174	<i>repAW175Amber-S278N</i> Δ <i>parD</i> , <i>aphA1</i> ⁺	W175Y (TGG-TAG) S278N (AGC-AAC)	This work
pAB174-A52V	pAB174	<i>repAA52V</i> Δ <i>parD</i> , <i>aphA1</i> ⁺	A52V (GCG-GTG)	This work
pAB174-G248E	pAB174	<i>repAG248E</i> Δ <i>parD</i> , <i>aphA1</i> ⁺	G248E (GGA-GAA)	This work
pAB174-R55H	pAB174	<i>repAR55H</i> Δ <i>parD</i> , <i>aphA1</i> ⁺	R55H (CGT-CAT)	This work
pAB174-L212F	pAB174	<i>repAL212F</i> Δ <i>parD</i> , <i>aphA1</i> ⁺	L212F (CTT-TTT)	This work
pAB174-Q6P	pAB174	<i>repAQ6P</i> Δ <i>parD</i> , <i>aphA1</i> ⁺	Q6P (CAA-CCA)	This work
pAB174-OriR1	pAB174	Mutation in the OriR1, Δ <i>parD</i> , <i>aphA1</i> ⁺		This work
pKN1562-Q209Amber	pKN1562	<i>repAQ209Amber</i> , <i>parD</i> ⁺ , <i>aphA1</i> ⁺	Q209Y (CGC-AGC)	This work
pKN1562-A52S	pKN1562	<i>repAA52S</i> , <i>parD</i> ⁺ , <i>aphA1</i> ⁺	A52S (GCC-ACC)	This work
pKN1562-A54T	pKN1562	<i>repAA54T</i> , <i>parD</i> ⁺ , <i>aphA1</i> ⁺	A54T (GCC-ACC)	This work
pKN1562-R70T	pKN1562	<i>repAR70T</i> , <i>parD</i> ⁺ , <i>aphA1</i> ⁺	R70T (CGG-TGG)	This work
pKN1562-Q183Amber	pKN1562	<i>repAQ183Amber</i> , <i>parD</i> ⁺ , <i>aphA1</i> ⁺	Q183Y (CAG-TAG)	This work
pKN1562-Q175Amber	pKN1562	<i>repAQ175Amber</i> , <i>parD</i> ⁺ , <i>aphA1</i> ⁺	Q175Y (TGG-TAG)	This work
pKN1562-R55H	pKN1562	<i>repAR55H</i> , <i>parD</i> ⁺ , <i>aphA1</i> ⁺	R55H (CGT-CAT)	This work
pKN1562-T151I	pKN1562	<i>repAT151I</i> , <i>parD</i> ⁺ , <i>aphA1</i> ⁺	T151I (ACA-ATA)	This work
pMLM126	pLNBAD	pLNBAD:: <i>kis</i> , <i>cam</i> ⁺		Lemonnier et al. (2004)

Cam⁺ Resistance to chloramphenicol. AphA1: resistance to kanamycin. Bold character indicates the base change introduced by the mutation. Note that due to the *supFts* mutation in OV2 tyrosine is introduced in the amber termination codons at the permissive temperature.

100%. For the qPCR analysis 800 ng of total DNA were serially diluted 6 folds (dilution factor = 5) and these dilutions were amplified by qPCR with the specific primers. A representation of the threshold cycle values obtained, C_t versus the logarithm of the DNA concentration, gives the standard curves corresponding, respectively, to the plasmidic *kis* gene or to the *lpp* chromosomal gene. A proper dilution of the same DNA preparation, giving a signal within the linear region of the standard curves, was used to calculate, in three independent experiments, the concentrations of *kis* and *lpp* genes corresponding to the pKN1562 culture. The R^2 value calculated for three pseudo-replicas in these experiments was >99.7. *kis* and *lpp* concentrations corresponding to cultures of the different pKN1562 mutants were obtained in a similar way. The plasmid copy number (PCN) per genome was calculated as:

Size of chromosomal DNA (bp) \times Amount of plasmid DNA (ng)/Size of plasmid DNA (bp) \times Amount of genomic DNA bound (ng).

The PCN calculated for pKN1562 was giving the value = 1; the PCNs per genome, calculated in a similar way for the pKN1562 mutants, were normalized to this value. In order to correct the undesirable contribution of plasmid-free segregants, the copy number values were referred to percentage of kanamycin resistant cells in the culture at the time the sample was taken.

2.5. Transcriptional analysis of *parD* by RTqPCR

The levels of transcription of the *kis* and *lpp* genes were evaluated by RTqPCR in cultures containing the different plasmids (see above). For this determination we isolated total RNA, using the Aurum Total RNA (Bio-Rad) kit, in cell cultures containing plasmids that were grown to a OD₆₀₀ ~0.5 as previously described. The RNA concentration was quantified with a Nano Drop spectrophotometer (BioRad Laboratories). Complementary DNAs to *kis* and *lpp* transcripts were obtained using reverse transcriptase on

Table 2

Primers used in this work.

Name	Sequence from 5' to 3'	Use
pKN1562-13	GCGGCGTTCGTTCACTATTG	Sequencing 5' <i>copB</i> region of pKN1562
CopBF	CGCCAACACAGATCTTCGTC	Sequencing 3' <i>copB</i> , <i>copA</i> and <i>tap</i> regions of pKN1562
pKN1562-1	ATATGCCCGGAAAGTTCAAGAC	Sequencing 5' <i>repA</i> region of pKN1562
RepA1R	GAAGGTGGATGATGAGATTGTT	Sequencing 3' <i>repA</i> region of pKN1562
pKN1562-2	CACGTAACCGCAATTACAGC	Sequencing <i>oriR1</i> region of pKN1562
XC	TATGGAAGCAACCACGCT	Sequencing <i>parD</i> region of pKN1562
LppF	AGGTTGCTCCAGCAACGCTAA	Amplify region in 5' of <i>lpp</i> gene
LppR	TTAGCAGGAGCTGCGTCATCT	Amplify region in 3' of <i>lpp</i> gene
KisF	GCATACCACCGACTGAAGAGG	Amplify region in 5' of <i>lpp</i> gene
KisR	GGATCACACTGTGCCAGTAGCT	Amplify region in 3' of <i>lpp</i> gene
T1511-F	ATTCCGACCGACATCACGTTCTACTGGCTCTGTTTGCTGCCCTTG	Introduce change ACA-ATA (Thr151Ile in <i>repA</i>)
T1511-R	CAAGGGCAGCAACAGAGCCAGTATGAACGTGATGTCGGTCGGAAT	Introduce change ACA-ATA (Thr151Ile in <i>repA</i>)
R55H-F	TGTGGCGCATGCCATTCCTGGTCTGCGTC	Introduce change CGT-CAT (Arg55His in <i>repA</i>)
R55H-R	GACGAGACCAACGGGAATGGGCATGCGCCACA	Introduce change CGT-CAT (Arg55His in <i>repA</i>)
P(D75E) (+)	TTGTACGTTGCGAACAACCCCGACAAT	Introduce change GAT-GAA (Asp75Glu in <i>kid</i>)
P(D75E) (−)	ATTGTCCGGGTTGTTTCGCAACGTACAA	Introduce change GAT-GAA (Asp75Glu in <i>kid</i>)
LppF	AGGTTGCTCCAGCAACGCTAA	Amplify region in 5' of <i>lpp</i> gene
LppR	TTAGCAGGAGCTGCGTCATCT	Amplify region in 3' of <i>lpp</i> gene
KisF	GCATACCACCGACTGAAGAGG	Amplify region in 5' of <i>lpp</i> gene
KisR	GGATCACACTGTGCCAGTAGCT	Amplify region in 3' of <i>lpp</i> gene
T1511-F	ATTCCGACCGACATCACGTTCTACTGGCTCTGTTTGCTGCCCTTG	Introduce change ACA-ATA (Thr151Ile in <i>repA</i>)
T1511-R	CAAGGGCAGCAACAGAGCCAGTATGAACGTGATGTCGGTCGGAAT	Introduce change ACA-ATA (Thr151Ile in <i>repA</i>)
R55H-F	TGTGGCGCATGCCATTCCTGGTCTGCGTC	Introduce change CGT-CAT (Arg55His in <i>repA</i>)
R55H-R	GACGAGACCAACGGGAATGGGCATGCGCCACA	Introduce change CGT-CAT (Arg55His in <i>repA</i>)

300 ng of total RNA. For this reaction we used the primers annealing to the 3' regions of the RNA transcripts corresponding to *kis* and *lpp* (see Table 2). To make a standard curve the correlation between C_t and ssDNAs (RNAs) concentration was obtained by qPCR amplification of the ssDNAs. Serial dilutions (dilution factor = 10) of the reverse transcriptase reaction were used. The qPCR for the different samples was done using a dilution of the ssDNA products that gave a C_t value within the linear region of the standard curves. The *kis* transcriptional levels were calculated as $2^{(C_t(lpp) - C_t(kis))}$ where $C_t(lpp)$ and $C_t(kis)$ are the threshold values corresponding to the PCR amplification of *lpp* and *kis*. The relative transcriptional levels were referred in all cases to the plasmid copy number.

3. Results

3.1. Analysis of the “interference phenotype” observed in pKN1562

In order to identify the key factor involved in coupling replication and *parD* maintenance modules of plasmid R1, we took advantage of the negative effect of the *parD* system in the rescue of conditional plasmid replication mutants, that we called henceforth the “interference phenotype”.

To characterize this phenotype we determined the ratio between the replication thermosensitive mutants (Repts) and mutants conferring thermosensitivity to the kanamycin resistance (AphA) that can be rescued after a mutagenic treatment in three *aphA*⁺ mini-R1 plasmids: (i) the *parDwt* plasmid pKN1562; (ii) its *parD* deletion derivative pAB174, and (iii) pJLV01, that carries the point mutation *kidD75E* that specifically inactivates the RNase activity of the toxin but not its co-regulatory activity. To select for these mutants, 30 °C was used as the permissive tempera-

ture and 42 °C as the restrictive one. In these experiments the three mini-R1 plasmids were mutagenized *in vitro* with hydroxylamine. Subsequently the plasmids were rescued by transformation in OV2 *E. coli* cells selecting transformants at 30 °C in LA medium containing kanamycin. Then the transformants were picked from the selective plates and streaked two consecutive times in LA plates without antibiotic that were incubated at 42 °C. After the second propagation in the absence of selection, the colonies were tested for growth at 30 and 42 °C in LA plates containing kanamycin. AphA mutants grow at 30 °C but not at 42 °C. Repts mutants grow neither at 30 °C nor at 42 °C, due to the loss of the plasmid during the previous propagation at 42 °C in LA medium. The ratio between the two types of thermo-sensitive mutants rescued in each experiment was determined.

In the presence of a functional *parD* system, but not in its absence, the interference phenotype should result in a clear reduction of the Repts/AphA ratio. Indeed this was the case: the Repts/AphA ratio found was 1 in cells transformed with mutagenized pAB174 (Repts/AphA = 19/19 = 1) or pJLV01 (Repts/AphA = 11/11 = 1) but this value was reduced to 0.3% in cells transformed with the mutagenized pKN1562 plasmid (Repts/AphA = 6/19 = 0.3). The similar Repts/AphA values obtained in pAB174 and pJLV01 plasmids indicate that the modular coupling analyzed requires the RNase activity of the Kid toxin but not its co-regulatory capacity.

3.2. Characterization of the Repts mutants: location, copy number determinations and *parD* transcription analysis

To analyze further the above results, we identified the location of the *repts* mutations in the basic replicon of the plasmid and determined their effects in plasmid copy number at the permissive temperature. With the exception

of two mutations isolated in *oriR1* and in *tap*, the origin of plasmid replication and the gene coding the translation adaptor peptide (see discussion), the rest of the *repts* mutations were located in *repA*, the gene of the plasmid replication initiation protein. In pJLV01 or in pAB174 having inactive *parD* systems, the mutations were located along the whole *repA* sequence but in pKN1562, that carries a wild type *parD* system, their locations seem to be restricted to two particular regions corresponding to aminoacids 52–70 and 175–209 of the RepA protein (Fig. 1B).

Further information on these mutants was obtained by determination of their relative copy numbers in cells growing at 30 °C (Fig. 2). Compared to *repA*wt pKN1562, all the Repts mutants had a reduced plasmid copy number. The *repts* mutations isolated in plasmid pKN1562 seem to support relative copy numbers ranging between 0.2 and 0.9 while the relative copy numbers (PCN) of *repts* mutations isolated in pJLV01 ranged between <0.2 and 0.6 (see Fig. 2).

The transcriptional level of *parD* per copy number in the different Repts mutants isolated in pKN1562 and pJLV01 was determined by RT-qPCR analysis (see Section 2.5 above) and the values obtained are shown Fig. 2. The results indicate that *parD* system is deregulated in all the

Repts mutants and that this deregulation follows approximately an inverse relationship to the PCN. Note that this transcriptional analysis was also possible in pJLV01 due to the fact that the *kidD75E* mutation specifically affects the RNase activity of the Kid toxin but not its co-regulatory activity.

3.3. Comparative analysis of *repA*ts mutations in the presence or absence of a functional *parD* system

The correlation between *parD* transcription level and the efficiency of replication in the presence or in the absence of a functional *parD* system was analyzed comparatively using the mutations *repA55* and *repA151* that change, respectively, R55 for H and T151 for I aminoacids in RepA protein. These mutations were isolated in pJLV01 (*parD-kidD75E*); then they were introduced in pKN1562 by site-directed mutagenesis. In pJLV01 the relative copy number corresponding to the *repA55* or *repA151* mutations were 0.3 and <0.2, respectively. These values increased in the *parD*⁺ background (pKN1562) to values 0.8–1 and 0.2 (Fig. 3A). This indicates that the replication rescue by *parD* is inefficient in Repts mutants supporting very low copy

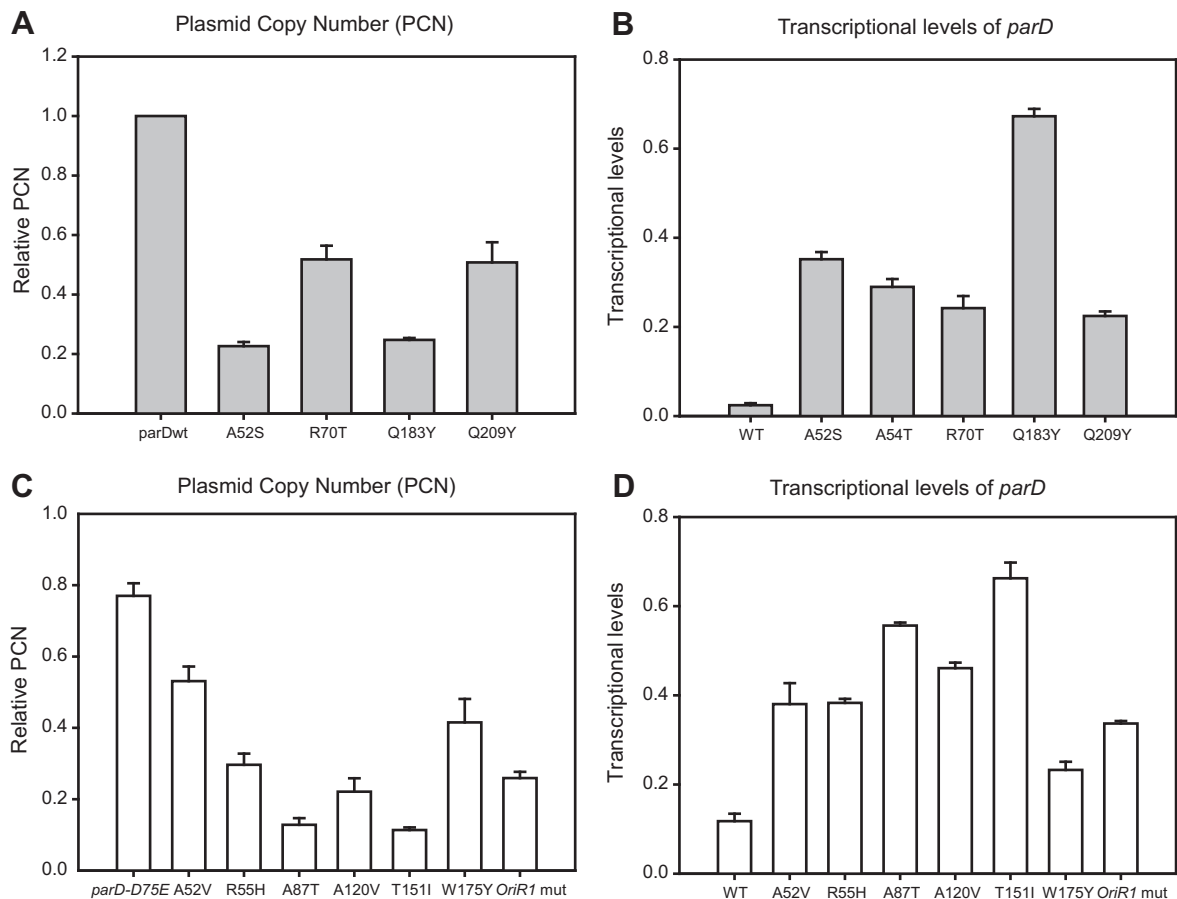


Fig. 2. Relative PCN and *parD* transcriptional levels of the plasmids analyzed. The values obtained for pKN1562 plasmid and its derivatives are shown with gray bars, while the ones obtained for pJLV01 and its derivatives are shown in white. Panels (A) and (C) show, respectively, the relative PCN of pKN1562 and pJLV01 plasmid mutants; the wt pKN1562 PCN value was used as a reference. Panels (B) and (D) show, respectively, the *parD* transcriptional values per plasmid copy obtained for pKN1562 and pJLV01 and their Repts mutants.

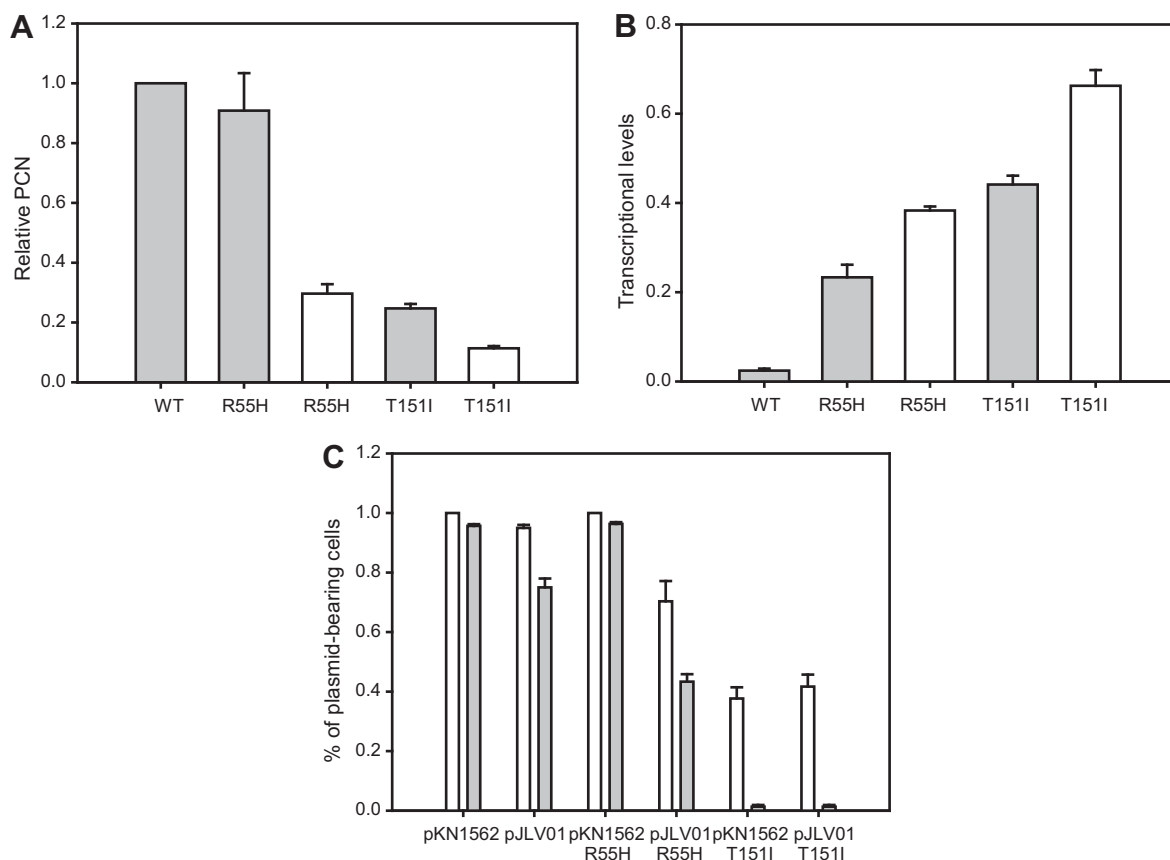


Fig. 3. Comparative analysis of the effects of *repA*ts mutations in pKN1562 and pJLV01 plasmids. Panels (A), (B) and (C) show, comparatively, the PCN, *parD* transcriptional level and plasmid stability of pKN1562 (gray bars) or pJLV01 (white bars) plasmids carrying the *repAR55H* or *repAT151I* mutations. White and gray bars in panel C correspond, respectively, to the percent of kanamycin resistance cells after the first and second propagations at 30 °C in LA plates without antibiotic.

number in pJLV01 but clearly significant when this value is at least 0.3.

The effects of these two mutations on the *parD* transcriptional levels were also determined in the *parD*⁺ (pKN1562) and in the *parD*[−] (pJLV01) backgrounds. Both mutations clearly deregulated the *parD* system in an inverse relationship to their copy numbers (Fig. 3B). Plasmid stability determinations correlated with the copy number of these mutants (Fig. 3C).

An interesting result found in this analysis is that the relative levels of *parD* transcription associated to these mutations were higher in the absence of a functional *parD* system (pJLV01) than in its presence (pKN1562). This suggested a role of the Kid RNase in down-regulating the *parD* transcriptional levels. In fact efficient cleavage sites for Kid RNase in which the core sequence 5′-UAC-3′ is flanked by an U can be found within the *kis* antitoxin gene in the polycistronic *parD* mRNA.

3.4. *Kis* antitoxin level is the key factor coupling the replication and *parD* modules of plasmid R1

As *Kis* antitoxin is the key element involved in *parD* regulation, a reduction in the levels of this protein could prob-

ably be responsible of the *parD* deregulation and *Kid* activation observed in the Repts mutants. The initial signal could be the decrease in *kis-kid* gene dosage due to inefficient plasmid replication. As the interference phenotype is a signature of the coupling between the replication and *parD* modules of plasmid R1 we took advantage of this phenotype to test this hypothesis. In the experiment we evaluated whether an increase in the levels of the antitoxin could neutralize the interference. For this purpose we transformed the mutagenized plasmid pKN1562 in a strain overproducing the *Kis* antitoxin (MG1655 bearing plasmid pMLM126) and in the parental strain (MG1655) and determined in each case the Repts/AphA_{ts} ratio as above. The interference phenotype was clear in the parental strain (Repts/AphA_{ts} = 7/27 = 0.26) but, as expected, this ratio increased drastically in the presence of the overproducer of *Kis* (Repts/AphA_{ts} = 10/8 = 1.2). In an independent experiment we repeated the same analysis but using as a receptor of the mutagenized pKN1562 DNA, a strain deleted of *lon* and *clpP*, the genes of the main proteases targeting the *Kis* antitoxin. The stability of the antitoxin greatly increases in this background (Diago-Navarro, unpublished results). The analysis indicated that increasing the stability of *Kis* abolished also the interference phenotype (Repts/

AphA_{ts} = 7/6 = 1.1). These data are consistent with the proposal that the decrease in the antitoxin level is a key factor coupling the replication and *parD* modules of plasmid R1.

4. Discussion

4.1. *parD* regulation and replication efficiency

Transcription of the *parD* TA system of plasmid R1 is regulated by specific interactions of the Kis antitoxin at the promoter operator region of *parD*, and this regulation is enhanced in the presence of the Kid toxin. In addition, *parD* transcription regulation responds to the relative levels of the Kis and Kid proteins: when the Kis antitoxin is in excess of the Kid toxin, *parD* is repressed and, conversely, when the Kid toxin is in excess, this system is deregulated. A Kis–Kid hetero-octamer was identified as the specific complex involved in regulation; a Kis–Kid hetero-hexamer, is an efficient Kid neutralization complex but an inefficient *parD* repressor (Monti et al., 2007). Due to the fact that the equilibrium between the neutralizing complex and the regulatory one is readily reversible, the recharge of the antitoxin levels following deregulation of the system restores the regulated situation. Thus the interplay between the Kid toxin and Kis antitoxin, functions as an oscillator that buffers the *parD* system toward the regulated situation (Fig. 4). This balance functions efficiently when the efficiency of plasmid replication is normal.

A different scenario occurs in the presence of mutations that reduce the efficiency of plasmid replication. These mutants seem to take the system out of the equilibrium resulting in the deregulation of the *parD* promoter and the partial activation of the Kid toxin as indicated by the

interference phenotype. The simplest explanation for this pattern is that the reduction in gene dosage associated with the inefficient replication reduces the levels of the antitoxin in the cell. This reduction is permanent in the plasmid replication mutants. The key roles of the antitoxin in toxin neutralization and in *parD* regulation and the neutralization of the interference phenotype by raising the antitoxin levels are consistent with this hypothesis. Note that poor titer of the Kis antibodies available in our laboratory prevented a direct evaluation of the fluctuations of the Kis levels in the cells.

4.2. Circular link between plasmid replication efficiency and *parD* activity

The above data point to a pathway linking the decrease in the replication efficiency of plasmid R1 to the decrease in Kis antitoxin levels and this to the deregulation of the system and to the Kid toxin activation; activation of Kid decreases the levels of the CopB mRNA, therefore increasing transcription of RepA from the *PrepA* and the efficiency of plasmid replication. In this way Kis would act as a sensor connecting the efficiency of plasmid replication and the activity of the *parD* system. Interruption of the pathway at a particular point should prevent the following stages in the pathway but not the first ones. In fact, activation of *parD* system by inefficient plasmid replication can be neutralized by increasing the efficiency of plasmid replication but this leads to a reduction of the *parD* transcriptional levels (Ruiz-Echevarria et al., 1995). We now show that inactivation of Kid toxin by the *kidD75E* mutation abolishes the interference phenotype but does not prevent the deregulation of the *parD* system in response to inefficient

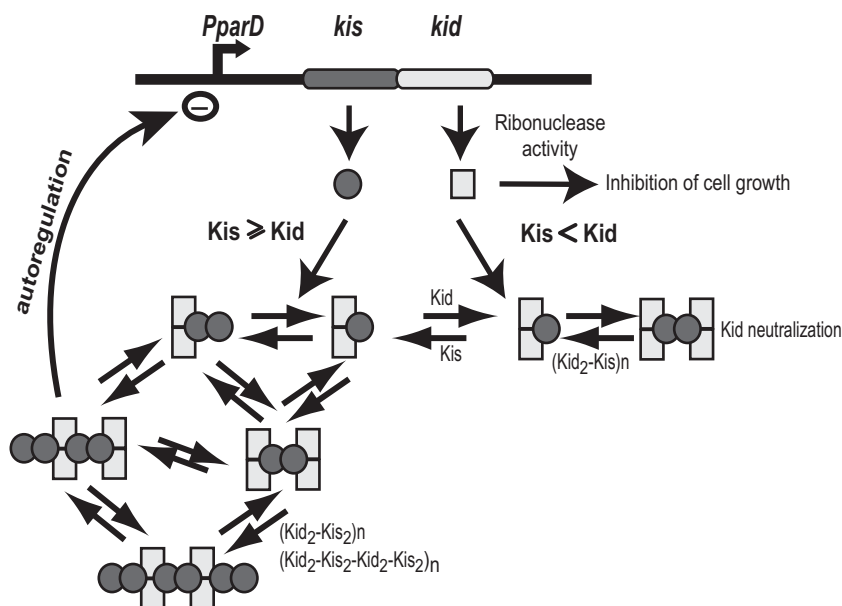


Fig. 4. Kis–Kid complexes involved in *parD* regulation and toxin neutralization. *parD* operon organization and stoichiometry of the Kis–Kid complexes formed in excess of Kis antitoxin (circles) or in excess of the Kid toxin (squares) are indicated. The hetero-octamer (excess of Kis) and the hetero-hexamer (excess of Kis) play specific roles in transcription regulation of *parD* and in toxin neutralization, respectively. Arrows indicate the dynamic interchanges between the different complexes and the interaction of the Kis–Kid hetero-octamer at the promoter–operator region of *parD*.

replication. It can be predicted that an increase in the intracellular levels of CopB should also neutralize the interference phenotype (Repts/AphAts close to 1) without preventing the deregulation of the system or the activation of the toxin.

4.3. Role of the *rep-parD* coupling

What could be the role of this coupling in the cell? As Kid modulates the replication rescue mediated by CopB, the coupling described here could, as CopB, play a role in rescuing plasmid replication during the first stages of the establishment of these genetic elements in a new host or during plasmid propagation in hosts limiting the efficiency of plasmid replication. Note that partial activation of the toxin within the cell associated to the modular coupling could also contribute to plasmid stabilization by inhibiting the proliferation of plasmid free segregants (Ruiz-Echevarria et al., 1995). Although pKN1562 can be integrated in the *oriC* region of the *E. coli* chromosome (Koppes and Nordstrom, 1986), it remains to be tested whether the modular coupling described here could limit the integration of the plasmid in *oriC* distal regions that support reduced gene dosage levels.

4.4. Value of the *repts* mutations to characterize functional regions in RepA

The *repA*ts mutations isolated in this analysis give valuable information on the RepA initiation protein. In the absence of interference, the plasmid R1 replication mutations isolated are spread over the whole *repA* gene suggesting multiple functional regions in the RepA protein. Indeed, the available model on the RepA–*oriR1* initiation complex (Giraldo and Diaz, 1992) is compatible with this suggestion. According to this model, dimers of RepA protein would bind specifically and sequentially to two distal and palindromic sequences in *oriR1* forming a loop. This loop would be subsequently filled with more RepA protein molecules that would enter in *oriR1* by RepA–RepA interactions. This nucleoprotein complex could guide the incorporation of the DnaA initiation protein in the *dnaA* box present in *oriR1* (Ortega et al., 1986). Thus the model suggests that there are at least four functional regions in the protein that could be targeted by the mutations: an interface of dimerization, a DNA binding region, a region involved in the RepA–RepA interactions needed to fill in the *oriR1* loop and a region involved in interactions with host replication factors (DnaA). Depending on the change introduced or the region affected, the mutations could have more or less drastic effects on plasmid replication.

It is interesting to note that although most of the mutations resulting in a conditional replication phenotype map in the *repA* gene, a CG–TA transition was found in the first base of the high affinity site for RepA present in *oriR1*, 5'-CATTAACTG-3' (Giraldo and Diaz, 1992). This mutation also decreases the copy number of the plasmid at the permissive temperature and deregulates the *parD* system (see panels C and D in Fig. 2). In addition, a mutation isolated in the open reading frame of the Tap protein, induces also a thermosensitive replication phenotype. Tap is the transla-

tion adaptor peptide required for RepA synthesis; regulation of RepA synthesis by CopA is due to the direct inhibition of Tap synthesis by this copy number controller (Blomberg et al., 1992). *oriR1* and *tap* are key elements required for initiation of plasmid R1 replication and therefore possible targets of *repts* mutations.

The combined biochemical and structural analysis of the conditional replication mutants described here should give important information on this key replication protein.

Acknowledgments

We greatly acknowledge financial support from the Spanish MICINN (projects BFU 2008-01566 and CSD2008-00013), the advice on copy number determinations by Bruno Gonzalez Zorn and the technical contribution of Alicia Rodríguez Bernabé.

References

- Bachmann, B.J., 1987. In: Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E. (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Washington, DC, pp. 1190–1219.
- Blomberg, P. et al., 1992. Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *EMBO J.* 11, 2675–2683.
- Bravo, A. et al., 1987. Identification of components of a new stability system of plasmid R1, *parD*, that is close to the origin of replication of this plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 210, 101–110.
- Casadaban, M.J., Cohen, S.N., 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138, 179–207.
- Diago-Navarro, E. et al., 2010. *parD* Toxin–antitoxin system of plasmid R1–basic contributions, biotechnological applications and relationships with closely-related toxin–antitoxin systems. *FASEB J.* 27, 3097–3117.
- Diago-Navarro, E. et al., 2009. A mutagenic analysis of the RNase mechanism of the bacterial Kid toxin by mass spectrometry. *FASEB J.* 27, 4973–4986.
- Diaz, R., Staudenbauer, W.L., 1982. Origin and direction of mini-R1 plasmid DNA replication in cell extracts of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 150, 1077–1084.
- Donachie, W.D. et al., 1976. Cell length, cell growth and cell division. *Nature* 264, 328–333.
- Gerdes, K. et al., 2004. Bacterial mitotic machineries. *Cell* 116, 359–366.
- Gerdes, K., Wagner, E.G., 2007. RNA antitoxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 117–124.
- Giraldo, R., Diaz, R., 1992. Differential binding of wild-type and a mutant RepA protein to *oriR* sequence suggests a model for the initiation of plasmid R1 replication. *J. Mol. Biol.* 228, 787–802.
- Hashimoto, T., Sekiguchi, M., 1976. Isolation of temperature-sensitive mutants of R plasmid by *in vitro* mutagenesis with hydroxylamine. *J. Bacteriol.* 127, 1561–1563.
- Kamphuis, M.B. et al., 2006. Model for RNA binding and the catalytic site of the RNase Kid of the bacterial *parD* toxin–antitoxin system. *J. Mol. Biol.* 357, 115–126.
- Koppes, L., Nordstrom, K., 1986. Insertion of an R1 plasmid into the origin of replication of the *E. coli* chromosome: random timing of replication of the hybrid chromosome. *Cell* 44, 117–124.
- Lee, C. et al., 2006. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 123, 273–280.
- Lemonnier, M. et al., 2004. Identification of residues of the Kid toxin involved in autoregulation of the *parD* system. *J. Bacteriol.* 186, 240–243.
- Light, J. et al., 1985. Transcription and its regulation in the basic replicon region of plasmid R1. *Mol. Gen. Genet.* 198, 503–508.
- Maniatis, T. et al., 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.
- Molin, S. et al., 1979. Clustering of genes involved in replication, copy number control, incompatibility, and stable maintenance of the resistance plasmid R1dtd-19. *J. Bacteriol.* 138, 70–79.
- Monti, M.C. et al., 2007. Interactions of Kid–Kis toxin–antitoxin complexes with the *parD* operator–promoter region of plasmid R1

- are piloted by the Kis antitoxin and tuned by the stoichiometry of Kid–Kis oligomers. *Nucleic Acids Res.* 35, 1737–1749.
- Muñoz-Gomez, A.J. et al., 2005. RNase/anti-RNase activities of the bacterial *parD* toxin–antitoxin system. *J. Bacteriol.* 187, 3151–3157.
- Nordström, K., 2006. Plasmid R1-replication and its control. *Plasmid* 55, 1–26.
- Nordström, K. et al., 1984. Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular biology, and physiology of the plasmid R1 system. *Plasmid* 12, 71–90.
- Nordström, K., Wagner, E.G., 1994. Kinetic aspects of control of plasmid replication by antisense RNA. *Trends Biochem. Sci.* 19, 294–300.
- Nuk, M.R. et al., 2011a. Functional analysis of the *finO* distal region of plasmid R1. *Plasmid* 65, 159–168.
- Nuk, M.R. et al., 2011b. The transfer operon of plasmid R1 extends beyond *finO* into the downstream replication genes. *Plasmid* 65, 150–158.
- Olsson, J.A. et al., 2004. Effect of the CopB auxiliary replication control system on stability of maintenance of Par(+) plasmid R1. *J. Bacteriol.* 186, 207–211.
- Ortega, S. et al., 1989. Isolation and characterization of a conditional replication mutant of the antibiotic resistance factor R1 affected in the gene of the replication protein *repA*. *Mol. Gen. Genet.* 217, 111–117.
- Ortega, S. et al., 1986. The involvement of host replication proteins and of specific origin sequences in the *in vitro* replication of miniplasmid R1 DNA. *Nucleic Acids Res.* 14, 4865–4879.
- Pimentel, B. et al., 2005. Kid cleaves specific mRNAs at UUACU sites to rescue the copy number of plasmid R1. *EMBO J.* 24, 3459–3469.
- Riise, E., Molin, S., 1986. Purification and characterization of the CopB replication control protein, and precise mapping of its target site in the R1 plasmid. *Plasmid* 15, 163–171.
- Ruiz-Echevarria, M.J. et al., 1995. A mutation that decreases the efficiency of plasmid R1 replication leads to the activation of *parD*, a killer stability system of the plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 129–135.
- Sambrook, J. et al., 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanger, F. et al., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.
- Zhang, J. et al., 2004. Interference of mRNA function by sequence-specific endoribonuclease PemK. *J. Biol. Chem.* 279, 20678–20684.

Interactions of Kid–Kis toxin–antitoxin complexes with the *parD* operator-promoter region of plasmid R1 are piloted by the Kis antitoxin and tuned by the stoichiometry of Kid–Kis oligomers

Maria C. Monti¹, Ana M. Hernández-Arriaga², Monique B. Kamphuis³,
Juan López-Villarejo², Albert J. R. Heck¹, Rolf Boelens³, Ramón Díaz-Orejas²
and Robert H. H. van den Heuvel^{1,*}

¹Bijvoet Center for Biomolecular Research and Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Department of Biomolecular Mass Spectrometry, Utrecht University, Sorbonnelaan 16, 3584 CA Utrecht, The Netherlands,

²Centro de Investigaciones Biológicas, Departamento de Microbiología Molecular, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain and ³Bijvoet Center for Biomolecular Research, Department of NMR Spectroscopy, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands

Received October 17, 2006; Revised December 30, 2006; Accepted January 24, 2007

ABSTRACT

The *parD* operon of *Escherichia coli* plasmid R1 encodes a toxin–antitoxin system, which is involved in plasmid stabilization. The toxin Kid inhibits cell growth by RNA degradation and its action is neutralized by the formation of a tight complex with the antitoxin Kis. A fascinating but poorly understood aspect of the *kid–kis* system is its autoregulation at the transcriptional level. Using macromolecular (tandem) mass spectrometry and DNA binding assays, we here demonstrate that Kis pilots the interaction of the Kid–Kis complex in the *parD* regulatory region and that two discrete Kis-binding regions are present on *parD*. The data clearly show that only when the Kis concentration equals or exceeds the Kid concentration a strong cooperative effect exists between strong DNA binding and Kid₂–Kis₂–Kid₂–Kis₂ complex formation. We propose a model in which transcriptional repression of the *parD* operon is tuned by the relative molar ratio of the antitoxin and toxin proteins in solution. When the concentration of the toxin exceeds that of the antitoxin tight Kid₂–Kis₂–Kid₂ complexes are formed, which only neutralize the lethal activity of Kid. Upon increasing the Kis

concentration, (Kid₂–Kis₂)_n complexes repress the *kid–kis* operon.

INTRODUCTION

Toxin–antitoxin systems in bacteria eliminate plasmid-free cells that emerge as a result of segregation or replication defects and they contribute to intra- and interspecies plasmid dissemination (1–3). Plasmid-encoded toxin–antitoxin systems and their chromosomal homologues are widespread in bacteria. Chromosomal toxin–antitoxin systems have been proposed to induce reversible cell cycle arrest or plasmid stabilization in response to nutritional and/or environmental stress. Toxin–antitoxin cassettes have a characteristic organization in which the gene encoding the toxin follows the gene encoding the antitoxin. The two loci have often a common autoregulatory mechanism exerted by both components. The toxin gene encodes a stable protein, whereas the antitoxin is either a non-translated, antisense RNA species (type I) or a labile protein (type II).

The majority of the plasmid and chromosome-encoded toxin–antitoxin loci is of the type II module (2). The toxin and antitoxin form a tight complex so that no free toxin is present in the cell. When a plasmid-free daughter cell is produced, owing to a defect in plasmid replication or maintenance, the newborn cell will still inherit the

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +31 302536797; Fax: +31 302518219; Email: r.h.h.vandenheuvel@chem.uu.nl or robert.vandenheuvel@organon.com

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors

Present address:

Robert H. H. van den Heuvel, Organon, P. O. Box 20, 5340 BH Oss, The Netherlands

toxin–antitoxin protein complex. However, the antitoxin component is degraded easily by host proteases and is not refreshed because of the absence of the plasmid encoding for the toxin–antitoxin system. The toxin will then act on an essential host target to cause growth impairment or cell death of the plasmid-free cell. In spite of the many studies on type II toxin–antitoxin systems, only two intracellular targets have been identified. CcdB and ParE are known to act on DNA gyrase (4,5), RelE mediates cleavage of mRNA in a ribosome-dependent manner, thereby affecting the level of protein synthesis (6) and MazF, Kid and YoeB proteins have been found to show ribosome-independent RNase activity (7–10).

Toxin–antitoxin systems that have been studied so far are autoregulated at the level of transcription by binding of the antitoxin to the operator-promoter region of the operon, however, the underlying molecular mechanism of this autoregulation is poorly understood. Several toxin–antitoxin pairs repress the transcription of their toxin–antitoxin operons, such as *mazEF*, *relBE*, *kid-kis*, *ccd*, *higAB* and *doc-phd*, indicating that an autoregulation process involving one or both proteins may be a common feature for these operons (11–15). In most of the cases, the antitoxin is directly responsible for the repression, but the toxin can also assist by increasing the affinity of the regulatory complex.

In *Escherichia coli*, the *parD* operon of plasmid R1 encodes the toxin Kid (Killing determinant) and the antitoxin Kis (Killing suppressor) (16). Kid is a ribonuclease, which cleaves RNA preferentially at the 5' side of the adenosine residue in the nucleotide sequence 5'-UA(A/C)-3' of single-stranded regions, although cleavage in double-stranded regions and at the 3' side of the adenosine has been observed as well (17,18). Kis prevents the inhibition of *E. coli* cell growth caused by Kid. Kis autoregulates *parD* transcription to a limited extent and this activity can be allocated to the N-terminal region of the protein (19). The coordinate action of the Kid–Kis complexes has been shown to efficiently repress *parD* transcription (11,18,20). In addition, synthesis of the Kid toxin is coupled to the synthesis of the Kis antitoxin and the intracellular levels of these proteins are also controlled by limited degradation of a polycistronic messenger (21). These regulatory mechanisms avoid the synthesis of the toxic component in case its antitoxin has not been translated previously and ensures a balanced production of the antitoxin relative to the toxin (22).

For *mazEF* and *ccd* addiction complexes it has been shown that the toxin and antitoxin can form various assemblies with different stoichiometries (23–25). Dao-Thi *et al.* (23) have proposed a model in which (CcdA₂–CcdB₂)_n complexes interact with multiple DNA-binding sites and spiral around the 120-bp promoter region. Kis and Kid also form various complexes. The Kid₂–Kis₂–Kid₂ heterohexamer is the most abundant species when Kid is in excess of Kis, whereas at higher concentrations of Kis, various complexes are present ranging from Kid₂–Kis₂ tetramer up to heterodecamers, however, the function of these complexes and especially the interactions with operator-promoter DNA has not

been elucidated (M.B. Kamphuis *et al.*, submitted for publication).

In this study, we aimed to unravel the mechanism of autoregulation at the transcriptional level of the type II toxin–antitoxin system *kid-kis* by analyzing the Kid–Kis complexes formed at the *parD* operon. We focused on the dynamic changes of the stoichiometry of Kid–Kis oligomers induced by binding of the *parD* operon and on their different binding affinity by using electrophoretic mobility shift assays, hydroxyl radical footprinting and macromolecular mass spectrometry. Mass spectrometry is a relatively new player in the field of structural biology of non-covalent protein–nucleic acid complexes, which allows for the analysis of multiple species in a single experiment (26,27). Moreover, in combination with gas-phase dissociation experiments, the data also provide insight in the global organization of complexes (28–30). Based on our results, we present a detailed model, which explains the transcriptional autoregulation process of the *parD* operon.

MATERIALS AND METHODS

Proteins and DNA

Kid toxin, ¹⁵N-labelled Kis antitoxin and His-tagged Kis were overexpressed and purified essentially as described previously (18,31, M.B. Kamphuis *et al.*, submitted for publication). The predicted masses for these proteins on the basis of the primary sequence were 12 038, 9689 and 10 885 Da, respectively.

The dsDNA fragments used for the DNA binding and footprinting assays were obtained from PCR amplification using the *Sau3A* fragment from pKN1562 as DNA template, including the *parD* operator-promoter region, cloned into the *Bam*HI site of pUC18. Oligonucleotides (1) 5'-TATGGAAGCAACCACGCT-3', (2) 5'-TCAGCATAACTGAGCC-3', (3) 5'-GTGCGTTAAAGCCTGGTGTGT-3' and (4) 5'-CACACCAGGCTTTAACGCAC-3' were synthesized. PCR was performed after 5'-end labelling of one of the oligonucleotides with [γ -³²P] ATP and T4 polynucleotide kinase. The size of the amplification products was 175-bp (oligonucleotides 1 and 2), 81-bp (oligonucleotides 1 and 4) and 115-bp (oligonucleotides 2 and 3). The 175-bp DNA fragment contains the operator-promoter of the *parD* operon (including region I and II) (Figure 2C), whereas the 115-bp and 81-bp DNA fragments contain only region I or II, respectively (Figure 4A and B). Each DNA fragment was analysed on a 5% polyacrylamide native gel. The end-labelled DNA fragments were eluted from the gel at 42°C for 12 h in a buffer containing sodium chloride (200 mM), Tris/hydrochloride (20 mM) and ethylenediamine tetraacetic acid (2 mM), pH 7.4. For mass spectrometry studies, we used a 30-bp *parD* DNA fragment (upper strand 5'-GGATGTTATATTTAAATATAACTTTTATGG-3'), containing *parD* region I plus 2 bp upstream and 5 bp downstream and a 30-bp dsDNA fragment with a random sequence (upper strand 5'-AGCTGCCAGGCACCAGTGTTCAGCGTCCTAT-3').

Macromolecular mass spectrometry

All mass spectrometry studies were performed in aqueous ammonium acetate (100 mM), pH 5.8. Mixtures of Kis, Kid and 30-bp *parD* region I DNA fragment were incubated at 20°C for 5 min before analysis. The Kis concentration was fixed at 7.5 µM when Kis alone or a Kid:Kis mixture at 2:1 molar ratio was incubated with dsDNA, whereas the Kis concentration was 15 µM when a Kid:Kis mixture at 1:1 molar ratio was incubated with *parD* DNA. The Kis:*parD* DNA molar ratios ranged from 80:1 to 20:1. Borosilicate glass capillaries (Kwik-Fil, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) were used on a P-97 puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) to prepare the nanoflow electrospray capillaries with an orifice of about 5 µm. The capillaries were subsequently coated with a thin gold layer (~500 Å) by using an Edwards ScanCoat Six Pirani 501 sputter coater (Edwards High Vacuum International, Crawley, UK).

For native mass spectrometry experiments, samples were introduced into a nanoflow electrospray ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometer (Micromass LC-T, Waters, Manchester, UK) modified for high mass operation and operating in positive ion mode. To generate intact ions *in vacuo* from protein complexes in solution, the ions were cooled by increasing the pressure in the first vacuum stages of the mass spectrometer. The pressure in the source region was adjusted to 7.0 mbar by reducing the pumping capacity of the rotatory pump by closing the speed-valve (32). In addition, nanoflow electrospray voltages were optimized for transmission of intact protein complexes and for efficient desolvation using capillary and cone voltages of 1200–1300 V and 50–60 V, respectively. All spectra were mass calibrated by using an aqueous solution of cesium iodide (5 mg/ml).

Tandem mass spectrometry is routinely used for the fragmentation of peptides, and more recently also for the gas-phase dissociation of protein complexes (29,30,33,34). In these experiments, ions of a defined *m/z* ratio are isolated by a (high-mass) quadrupole analyzer and subsequently dissociated by increasing the acceleration voltage in a gas-filled, usually argon or xenon, collision cell. Experimentally, it has been demonstrated that a preference is expected for the dissociation of the smallest protein and/or proteins that are at the surface of the complex. The proteins that dissociate usually take up a relatively large number of charges (35). For gas-phase dissociation experiments, samples were introduced into a Micromass Q-ToF 1 mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) equipped with a nanoflow Z-spray source and modified for high mass-to-charge ion isolation and high mass operation (29) and operating in positive ion mode. Precursor ions of selected complex compositions were isolated in the quadrupole analyzer and accelerated into an argon-filled collision cell. Different collision energies (10–150 V) were used in combination with a gas pressure of 0.8 mbar. The voltages were optimized for transmission of intact protein complexes and for efficient desolvation using capillary and cone voltages of 1200 and 60 V, respectively. To confirm each result, at least

two independent charge states were selected for each protein-*parD* DNA complex.

Mass spectrometry data analysis

The mass spectrometry data were semi-quantified to determine the relative amount of the protein complexes present in the different experiments. Data were accumulated over 2 min, averaged, smoothed and centred, thereby using the areas option in the software program MassLynx 4.0 (Waters). The total ion intensity for each complex was calculated by summing the intensity of all ions belonging to the Gaussian charge state envelope of the protein complex under analysis. The percentage of each protein complex was then calculated by using the total ion intensity of all identified protein complexes. The calculated relative abundances were based on two independent measurements.

Electrophoretic mobility shift assays

Binding of Kid and Kis proteins to 5'-end-labelled 175-bp *parD* region I/II, 81-bp *parD* region II or 115-bp *parD* region I fragment (1.4×10^6 c.p.m./mol) was determined according to a previously described method (36) with modifications. The binding reactions contained end-labelled DNA (2 nM), Tris/hydrochloride (70 mM), potassium chloride (200 mM), magnesium chloride (14 mM), sodium chloride (80 mM), ethylenediamine tetraacetic acid (40 mM), bovine serum albumin (100 µg/ml), glycerol (0.5% (v/v)) and Kid (2.4 µM) and/or Kis (0.075–9.6 µM). The assays were also performed with higher *parD* DNA concentrations (375 nM) and Kis (7.5 or 15 µM) and/or Kid (7.5 or 15 µM). The mixtures were incubated at 4°C for 60 min. Where indicated, poly [d(I-C)] (70 µM) as non-specific competitor DNA was added and incubation was continued for another 5 min at the same temperature. Free and bound *parD* DNA fragments were separated on polyacrylamide (5 or 8% (w/v)) native gels. The gels were run at 4°C in TBE buffer (Tris/hydrochloride (89 mM), boric acid (89 mM) and ethylenediamine tetraacetic acid (10 mM), pH 8.9) at 100 V for 60 min. The labelled DNA bands were visualized by autoradiography.

Hydroxyl radical footprinting

5'-End-labelled 175-bp *parD* region I/II or 115-bp *parD* region I fragment was incubated with Kid (2.4 µM) and/or Kis (4.8 µM) under the same conditions as in the electrophoretic mobility shift assays. After incubation, a solution containing iron sulphate (100 µM), ethylenediamine tetraacetic acid (200 µM), sodium ascorbate (1 mM) and hydrogen peroxide (0.3%) was added, and the mixture was incubated at 4°C for 5 min. The cleavage reaction was terminated by the addition of a mixture containing thiourea (8 mM) and ethylenediamine tetraacetic acid (1.7 mM). DNA-protein complexes were separated from free DNA by polyacrylamide 5% (w/v) gel electrophoresis and visualized by autoradiography. Bound DNA was eluted from gels at 42°C for 12 h, in buffer sodium chloride (200 mM), Tris/hydrochloride (20 mM) and ethylenediamine tetraacetic acid (2 mM), pH 8.0.

The DNA was precipitated with ethanol, dissolved in formamide-dye solution and analysed by polyacrylamide 8% (w/v) gel electrophoresis in the presence of urea (8 M). The cleavage products were visualized by autoradiography.

RESULTS

Antitoxin Kis, but not toxin Kid, interacts with *parD* DNA

Antitoxin Kis is known to be a weak transcriptional repressor of the *parD* operon, however, the characteristics of its interaction with the regulatory region of this operon are unknown (19). We first analysed by electrophoretic mobility shift assays, the interaction of Kis with a 175-bp DNA fragment (*parD* region I/II) containing sequences that include the operator-promoter region of the *parD* operon and further upstream sequences (Figure 1A). At Kis:*parD* region I/II molar ratios lower than 1200:1 no complex was observed between the protein and the *parD* DNA. At molar ratios of 1200:1 and 2400:1 (lanes 7 and 8) both free DNA and a mobility-shifted complex (c0) was observed, whereas at a molar ratio of 4800:1 (lane 9) no free *parD* DNA was observed. These data clearly show that Kis interacts with low affinity with the *parD* operon and the sharp transition from unbound DNA to the c0 complex points to a strong cooperative interaction of Kis onto the operator-promoter region.

The specific Kis contacts on the 175-bp *parD* region I/II fragment were further analysed by hydroxyl radical footprinting assays. These assays showed that Kis interacts in two imperfect inverted repeats (regions I and II) of 18 bp each and separated by 33 bp (Figure 2C). Region I contains a perfect palindromic sequence whose left half overlaps with the -10 promoter element in which protection of Kis is prominent, suggesting a direct role of these interactions in *parD* regulation.

The binding of Kid was tested under the same conditions, however, no complexes of Kid and *parD* DNA were observed, confirming that the toxin does not directly interact with the *parD* operon (Figure 1A, lane 10).

Kis-*parD* DNA interactions involve dimeric Kis subunits

We synthesized a 30-bp palindromic DNA fragment of the 175-bp *parD* region I/II, comprising region I, which we could use for nanoflow electrospray ionization mass spectrometry (Figure 2C). The 175-bp fragment is not suited for mass spectrometry studies as this large fragment retains many buffer and salt molecules, which represses the ion signal and introduces many satellite ion signals. From the mass spectra of the 30-bp *parD* region I and Kis we determined their molecular masses: 18 408.3 Da for *parD* DNA and 9687 Da and 19 373 Da for monomeric and dimeric Kis, respectively (Supplementary Table 1). The determined mass of the 30-bp *parD* DNA matches exactly with the theoretical mass, whereas the determined mass of monomeric Kis corresponds well with the mass as calculated from the primary sequence of ^{15}N -labelled Kis attached to a β -mercaptoethanol molecule (M.B. Kamphuis *et al.*, submitted for publication). Upon incubation of the 30-bp *parD* region I with a 20-fold molar excess of Kis, the mass spectrum clearly showed four charge-state distributions (Figure 3A, Supplementary Table 1). Two ion series were detected $\sim 2000\text{ m/z}$ and could be assigned to monomeric and dimeric Kis and two other ion series were detected at m/z values ~ 4500 . Mass determination of these latter two ion series revealed masses of 57 074 and 76 431 Da, which corresponds with the masses of $(\text{Kis}_2)_2\text{-DNA}_1$ and $(\text{Kis}_2)_3\text{-DNA}_1$ complexes, respectively. Upon increasing the amount of the 30-bp *parD* DNA relative to Kis (5-fold molar excess of Kis) also ions originating from free DNA and $\text{Kis}_2\text{-DNA}_1$ (37 801 Da) were identified (Figure 3B).

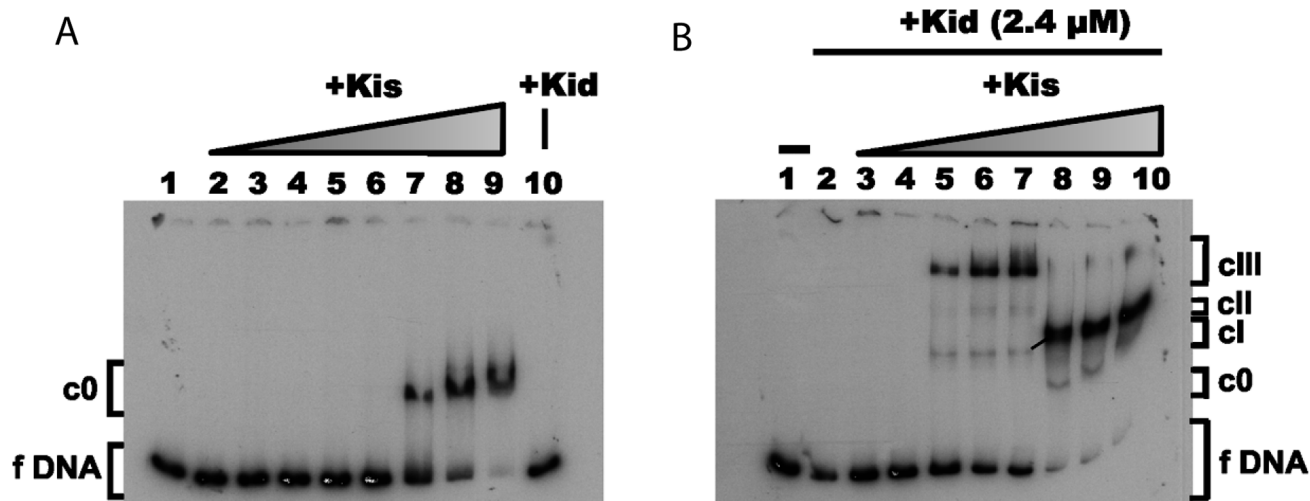


Figure 1. Effect of Kid on the interaction of Kis to *parD* DNA. Electrophoretic mobility shift assays were performed on the 5'-end-labelled 175-bp *parD* region I/II fragment (2 nM) and Kis and/or Kid. (A) Band-shift assays in the presence of a range of concentrations of Kis (0.075, 0.150, 0.300, 0.600, 1.2, 2.4, 4.8 and 9.6 μM) (lanes 2–9). Lane 10 presents control with only Kid (2.4 μM). (B) Band-shift assays over a range of Kis concentrations identical to the ones in (A) (lanes 3–10) and in the presence of a fixed concentration of Kid (2.4 μM). Lane 2 shows a control without Kid. Lane 1 presents the negative control without proteins. The specific complexes formed are indicated with c0, cI, cII and cIII.

Each protein–DNA complex involves at least one dimeric Kis unit showing that the Kis dimer is required for the specific recognition process.

Data analysis revealed that only ~15% of Kis was bound to DNA, whereas the remaining 85% was free in solution (Supplementary Table 2). This clearly demonstrates that antitoxin Kis interacts weakly with the *parD* region I. It should be noted here that ionization and transmission efficiency is protein and DNA dependent, therefore, we can only semi-quantify these data. To investigate whether the binding behaviour to the *parD* region I was indeed specific, the antitoxin Kis was added

to a solution containing a 30-bp dsDNA with a random nucleotide sequence. The mass spectra did not show any protein–DNA complexes (data not shown) confirming that the recognition of the *parD* region I by Kis is highly sequence specific. As expected, incubations of Kid with the 30-bp *parD* region I did not result in the formation of binary Kid–*parD* DNA complexes.

Toxin Kid enhances antitoxin Kis binding to *parD* DNA

We performed electrophoretic mobility shift assays on complexes between Kid and Kis mixed in different

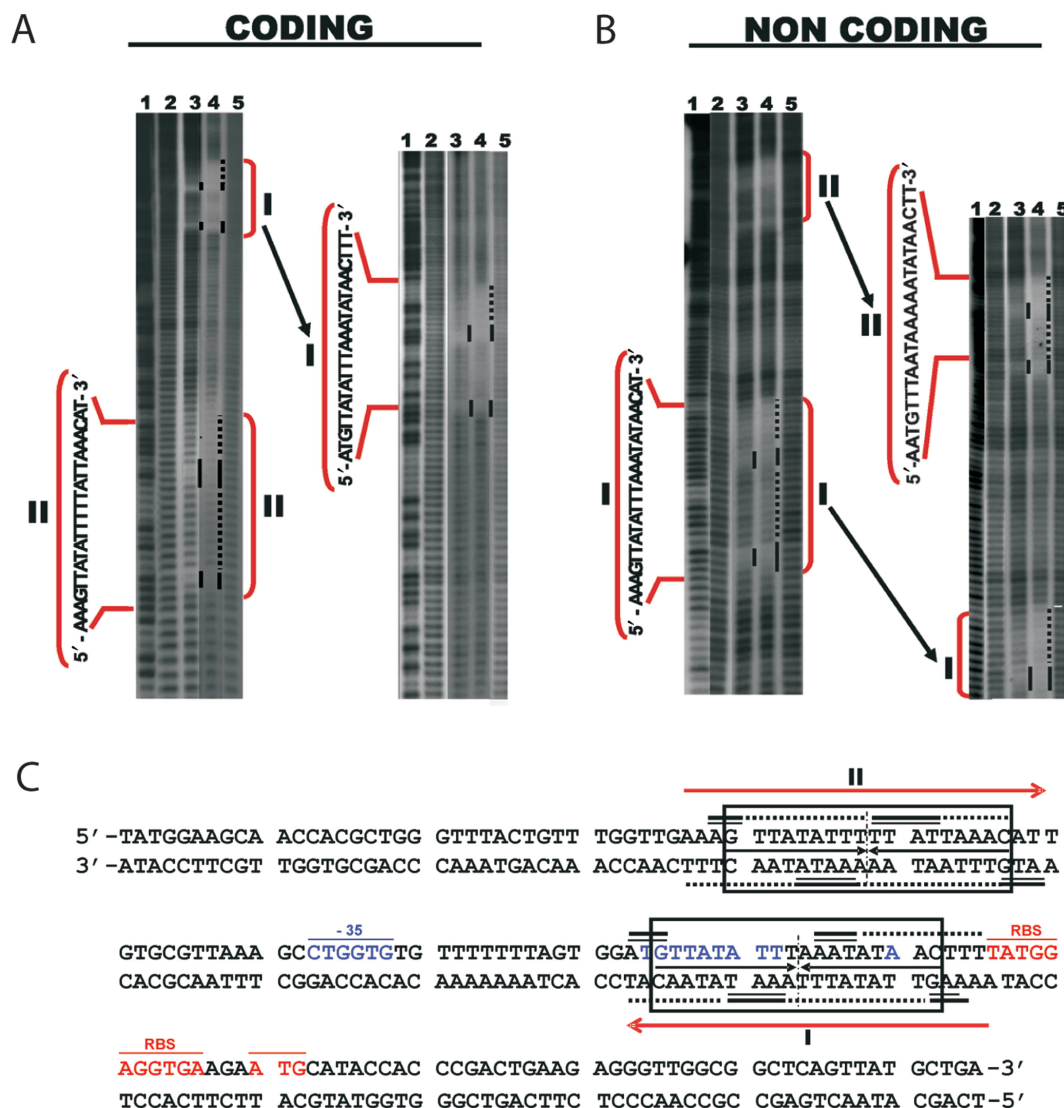


Figure 2. Kid–Kis and Kis interact at specific sites with *parD* DNA. Hydroxyl radical footprinting assays were performed on Kid–Kis mixtures (Kid–Kis ratio 1:2; Kid 2.4 and Kis 4.8 μ M) and Kis (4.8 μ M) alone on the 175-bp *parD* region I/II fragment. Protections in the coding (A) and non-coding (B) strands are indicated by black bars and dots. Lane 3 shows the protection pattern by Kis alone and lane 4 shows the protection pattern by the Kid–Kis complex. The sequences of the inverted repeats I and II that include the protected regions are indicated. Lanes 2 and 5 show the cleavage pattern of the DNA in the absence of any added protein. Lane 1 shows the Maxam–Gilbert AG ladder sequence. (C) Summary of the protected sites in *parD* region I/II by Kis and Kid–Kis complexes. The protected regions are indicated with numbers I and II. Region I contains an 18-bp perfect two-fold symmetry element (boxed) that includes the –10 motif. The site II includes an 18-bp pseudo-symmetric element that is also boxed. The dyad symmetry axis in each region is indicated with a broken line. Bases whose deoxyriboses are protected by Kis (thick bars) or Kid–Kis (thin bars) from cleavage by hydroxyl radical are indicated (underlined). DNA sequence of the –35 (underlined and labelled) and –10 elements of the promoter and the transcription initiation site are in blue. The ribosome-binding site (RBS) and translation initiation codon (Met) of *kis* are underlined and in red. The imperfect inverted repeats I and II are indicated with red arrows. The 30-bp DNA fragment used for mass spectrometry studies contains *parD* region I plus 2 bp upstream and 5 bp downstream.

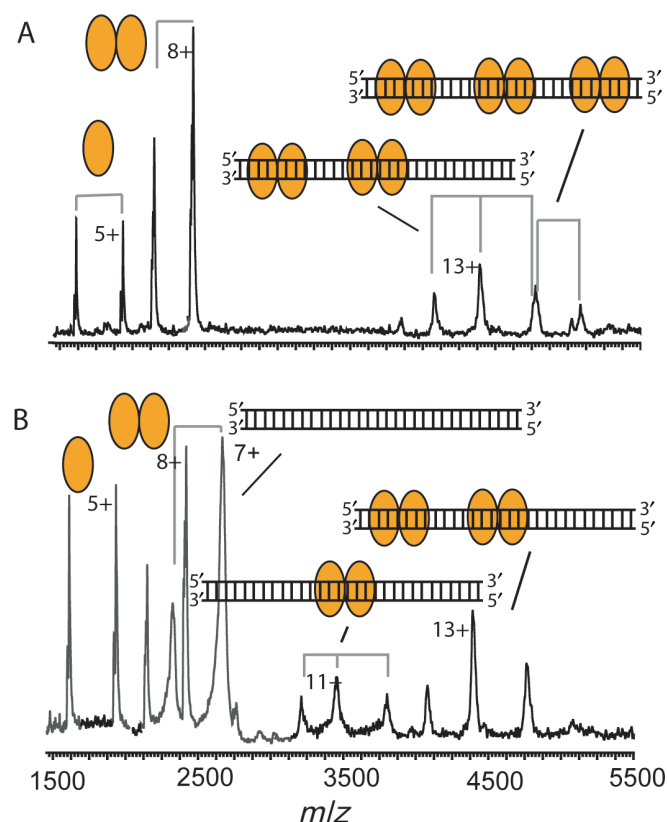


Figure 3. Dimers of Kis interact with *parD* region I. Macromolecular native mass spectrometry was performed on Kis-30-bp *parD* region I complexes in ammonium acetate (50 mM), pH 5.8. (A) Mass spectrum of the Kis:*parD* region I mixture at a molar ratio of 20:1 (Kis 7.5 μ M). (B) Mass spectrum of Kis:*parD* region I mixture at a ratio of 5:1 (Kis 7.5 μ M). Kis monomer and dimer are indicated with single and double orange ellipses, respectively, and the *parD* region I fragment with a double strand. Each complex is represented by an appropriate combination of ellipses and/or DNA double strand. Molecular masses and relative amounts of complexes are shown in Supplementary Tables 1 and 2, respectively.

oligomeric ratios and the 175-bp *parD* region I/II. The retardation of the *parD* DNA by Kis in the presence of a fixed concentration of Kid is shown in Figure 1B. The first mobility-shifted complexes were observed at a Kid:Kis:*parD* region I/II molar ratio of 1200:150:1 (lane 5). At this ratio, free DNA and three different mobility-shifted complexes were observed. The high intensity band was the largest complex (cIII), whereas the two additional bands (cII and cI) with lower intensity had a lower mass. The same pattern was also observed at Kid:Kis molar ratios of 4:1 and 2:1 (lanes 6 and 7).

At an equal concentration of both proteins, however, nearly no free DNA and complex cIII were detected and the intensity of complex cI was dramatically increased (lane 8). A less intense band (c0) that may correspond to DNA bound by Kis alone was also detected. The same pattern was maintained at decreased Kid:Kis molar ratios of 1:2 and 1:4 (lanes 9 and 10). These data show that when the concentration of Kis approaches that of Kid there is a dramatic shift in the complexes formed between Kid-Kis and *parD* region I/II, and the complexes with the DNA fragment become more stable. The data also show that

in the presence of Kid the ternary complexes formed at higher concentrations of Kis over DNA have a lower molecular mass than the complexes formed at lower concentrations of Kis, suggesting that there are multiple binding sites for the Kid-Kis complex in the operator-promoter region of the DNA and that the ratio between the two proteins plays an important role in the formation of an efficient repressor complex. We can, however, not fully exclude that migration may also be affected by DNA bending or other conformational changes.

The Kid-Kis-*parD* DNA interactions were further analysed by DNA footprinting assays (Figure 2). At a molar ratio Kid:Kis:*parD* region I/II of 1200:2400:1, in which complexes c0 and cI were present, the protection in complex cI occurred in the same two imperfect inverted repeats (regions I and II), which were also protected by Kis alone. As Kid does not bind directly to DNA these results indicate that Kis pilots the specific interaction of this complex in the operator-promoter region. Moreover, the data show that the spacer region of 33 bp is not protected by the proteins.

***parD* region I interacts stronger with Kis and with Kid-Kis complexes than *parD* region II**

The regions I and II were identified as the binding sites of Kis and Kid-Kis complexes in the *parD* operator-promoter region. With the aim to evaluate the binding of Kis and Kid-Kis complexes to isolated regions I and II, two different DNA fragments were produced: a 115-bp fragment comprising region I and an 81-bp fragment comprising region II (Figure 4A and B). The retardation of *parD* region I and *parD* region II by Kis is shown in Figure 4C and D. When using *parD* region I, a mobility-shifted complex (cIV) was observed at molar ratios Kis:*parD* equal or higher than 2400:1 (lanes 9 and 10), whereas, when using *parD* region II, a mobility-shifted complex (cIV) was observed at a Kis:*parD* molar ratio of 4800:1 (lane 10). These results thus show that the antitoxin Kis alone interacts specifically with both *parD* fragments, but the interaction with region I was tighter than with region II. The electrophoretic mobility shift assays were also performed with mixtures of Kid and Kis (Figure 4C and D). As in the assays with the 175-bp *parD* region I/II fragment, a fixed concentration of Kid and a variable concentration of Kis was used. For the *parD* region I fragment the first mobility-shifted complex was observed at a Kid:Kis:*parD* molar ratio of 1200:150:1 (lane 2), whereas for the *parD* region II fragment the first mobility-shifted complex was observed at a Kid:Kis:*parD* molar ratio of 1200:600:1 (lane 4). Thus, the affinity of the Kid-Kis complexes for *parD* region I is higher than for region II, which is in full agreement with the DNA binding assays using only Kis. The type of complexes formed between *parD* fragments and Kid-Kis complexes was dependent on the ratios between the two proteins. When the concentration of Kis was lower than the concentration of Kid, complex cVI was most abundant, whereas when the concentration of Kis approached the concentration of Kid, complex cV became more abundant. An additional complex (cIV) observed at an excess of Kis, may

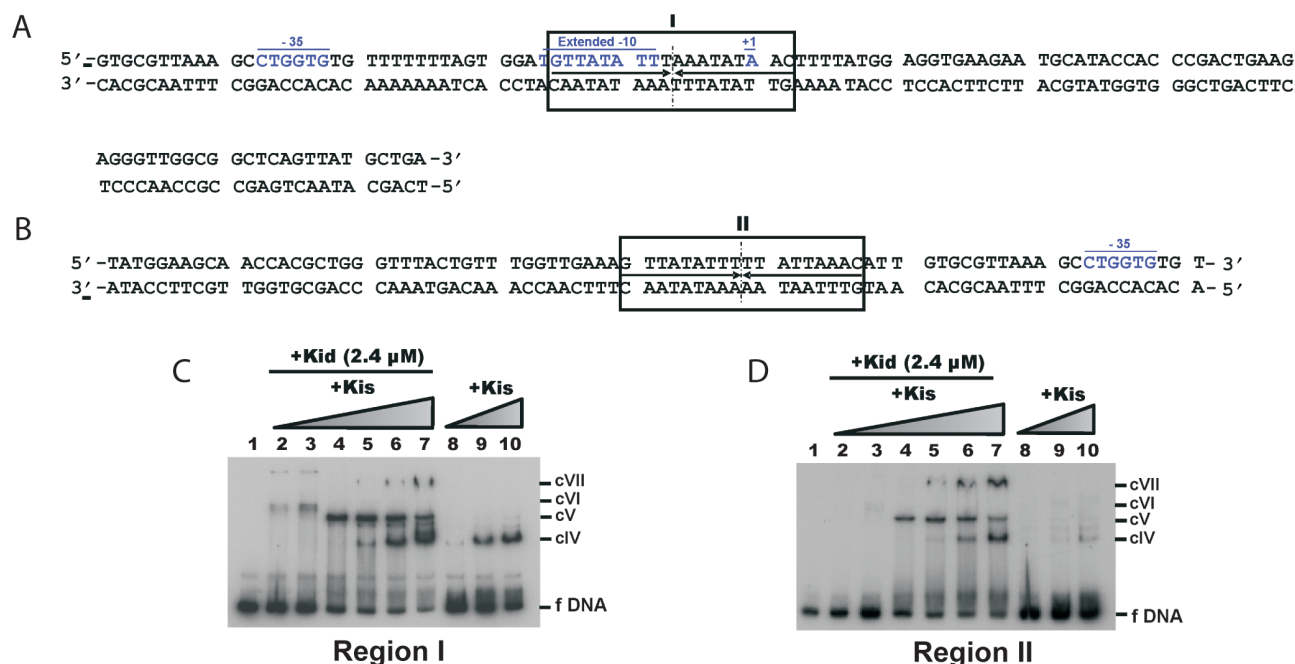


Figure 4. Kis and Kid-Kis complexes interact tighter to *parD* region I than to the *parD* region II. (A and B) Summary of the protected sites in region I and II of *parD* by Kis and Kid-Kis complexes. The 18-bp symmetric element (region I) and the 18-bp pseudo-symmetric element (region II) are boxed, and the broken lines indicate the symmetry axis. The sequence of the -35 and the extended -10 motifs and the initiation transcription (+1) are underlined and in blue. (C and D) Electrophoretic mobility shift assays were performed on the 5'-end-labelled 115-bp *parD* region I fragment (2 nM) or on the 5'-end-labelled 81-bp *parD* region II fragment (2 nM) and Kis alone (2.4, 4.8 and 9.6 μ M) (lanes 8–10) or a combination of Kid (2.4 μ M) and Kis (0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 and 9.6 μ M) (lanes 2–7). Lane 1 presents the negative control without proteins. The specific complexes formed are indicated with cIV, cV, cVI and cVII.

represent the binding to Kis alone, as it was also present in the incubations between Kis and *parD* DNA. A similar pattern was also observed with the *parD* region I/II fragment, although the abundance of complex c0 was very low (Figure 1). These differences between the isolated *parD* regions I and II and *parD* region I/II may suggest cooperative interactions between regions I and II.

The specific contacts between *parD* region I fragment and Kis or Kid-Kis complexes were further studied by hydroxyl footprinting assays (Supplementary Figure 1). The protection pattern clearly showed that the interactions of either Kis (cIV) or Kid-Kis complexes (cV) occur specifically on region I and involve in both cases the same backbone DNA contacts. The protection pattern observed in region I is in accordance with the footprint observed in the same operator region I in the 175-bp *parD* region I/II fragment (Figure 2). It should be noted here, however, that although the affinity with region I was higher than with region II, the protected sites observed in both regions in the 175-bp *parD* region I/II fragment had similar intensities. This again suggests cooperative interactions between regions I and II.

A molar excess of Kid results in labile (Kid₂-Kis₂-Kid₂)_n-*parD* DNA₁ complexes

The retardation assays showed that multiple mobility-shifted complexes can be formed between Kid, Kis and *parD* operon, but do not allow determination of the stoichiometry of the complexes. Therefore, we studied

the Kid-Kis oligomers involved in interaction with the 30-bp *parD* region I by macromolecular native mass spectrometry.

Initially, Kid and Kis were mixed at a molar ratio of 2:1, yielding the Kid₂-Kis trimer (33 820 Da) and the Kid₂-Kis₂-Kid₂ hexamer (67 716 Da) (Supplementary Table 1; Figure 5A). Upon the addition of the *parD* region I at a molar ratio Kid:Kis:*parD* of 80:40:1 several intriguing changes were observed in the mass spectrum (Figure 5B); the trimer-hexamer equilibrium was shifted towards the hexamer and the *parD* region I interacted with the Kid-Kis complexes. The mass spectrum showed different ion series and mass determination revealed that these ion series represented free Kid dimer, Kid₂-Kis trimer, Kid₂-Kis₂-Kid₂ hexamer, (Kid₂-Kis₂-Kid₂)₁-(DNA)₁, (86 079 Da) (Kid₂-Kis₂-Kid₂)₂-(DNA)₁ (153 968 Da) and (Kid₂-Kis₂-Kid₂)₃-(DNA)₁ (221 957 Da) complexes. Intriguingly, in this mixture about 57% of the Kid-Kis complexes were not bound to DNA (Supplementary Table 2). These results show that at least one antitoxin Kis dimer is required for the *parD* DNA binding, also when the toxin Kid is present. Since this requirement holds only the hexamer and not the trimer, the shift of the trimer-hexamer equilibrium was induced by *parD* region I binding.

Next, we mixed the *parD* region I with Kid:Kis in a molar ratio of Kid:Kis:*parD* 20:10:1 (Figure 5C). The spectrum showed two major protein ion series corresponding to free Kid₂-Kis₂-Kid₂ hexamer and Kid₂-Kis₂-Kid₂

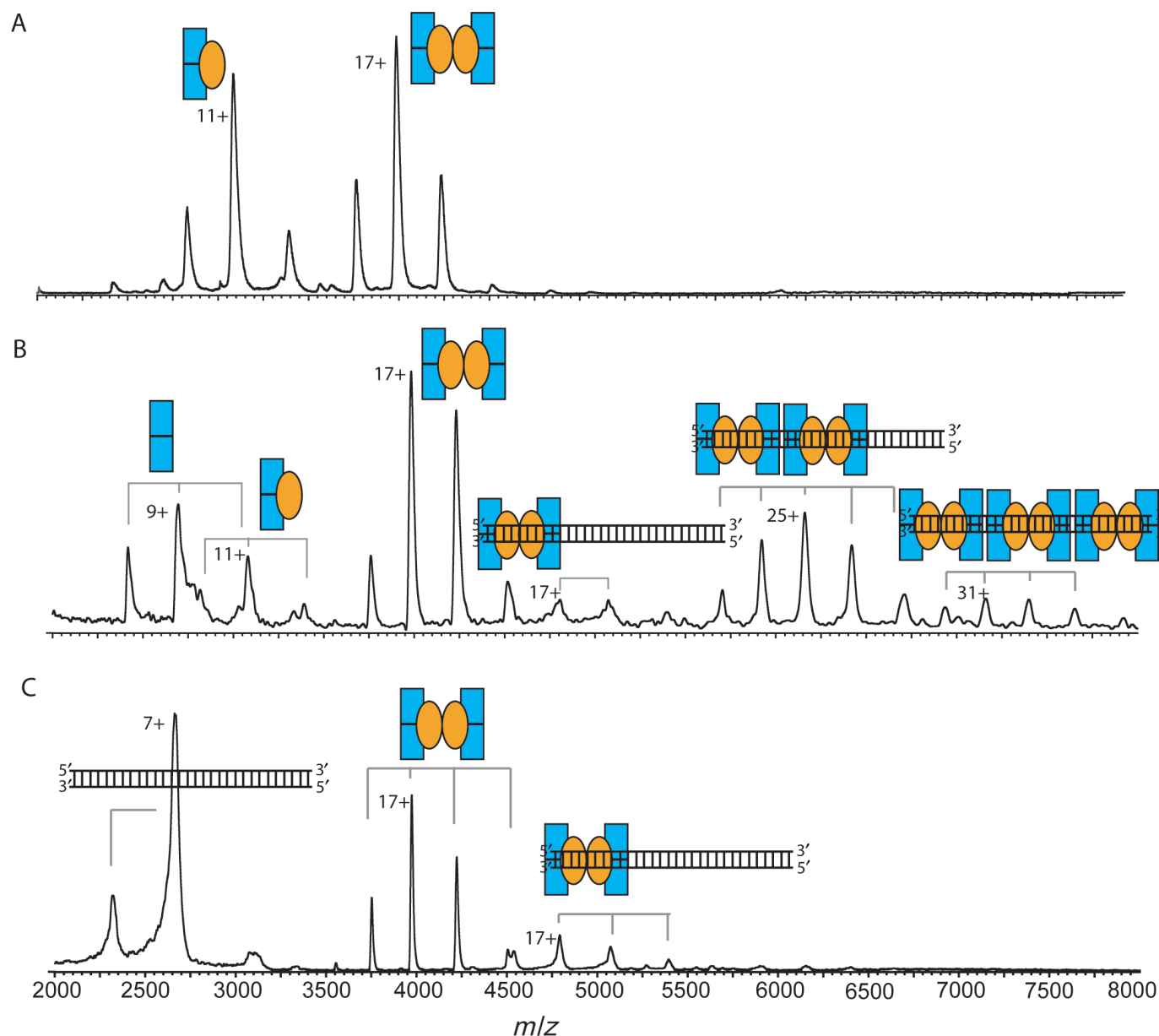


Figure 5. Kid-Kis complexes (molar ratio of 2:1) interact with *parD* region I. Macromolecular native mass spectrometry was performed on Kid-Kis and on Kid-Kis-*parD* DNA complexes in ammonium acetate (50 mM), pH 5.8. (A) Mass spectrum of a mixture of Kid:Kis at a molar ratio of 2:1 (Kis 7.5 μ M) and (B) and (C) mass spectra of mixtures of Kid:Kis:*parD* DNA mixtures at molar ratios of 80:40:1 and 20:10:1 (Kis 7.5 μ M), respectively. Kid and Kis are indicated with blue rectangles and orange ellipses, respectively, and the *parD* DNA fragment with double strand. Each complex is represented by an appropriate combination of rectangles, ellipses and/or DNA double strand. Molecular masses and relative amounts of complexes are shown in Supplementary Tables 1 and 2, respectively.

bound to *parD* DNA at a 1:1 stoichiometry (86 077 Da). These data thus clearly show that upon increasing the DNA concentration relative to Kis there is a preference for the binding of only one hexamer to the *parD* DNA. Moreover, the high amount of free Kid₂-Kis₂-Kid₂ hexamer (relative abundance of 80%) indicates a relatively low affinity between DNA and the hexameric Kid-Kis complex. This suggests that in conditions in which the Kid concentration exceeds the Kis concentration, only labile complexes are formed between *parD* DNA and Kis. This is consistent with the fact that Kid-Kis complexes formed

on the 175-bp *parD* operon in excess of Kis can be easily competed by poly-(dIdC) (data not shown).

Equal concentrations of Kid and Kis induce formation of stable Kid₂-Kis₂-Kid₂-Kis₂-*parD* DNA₁ complexes

Upon mixing Kid and Kis at a 1:1 molar ratio, we observed multiple complexes: Kid₂-Kis trimer (33 841 Da), Kid₂-Kis₂ tetramer (43 450 Da), Kid₂-Kis₂-Kid₂ hexamer (67 722 Da) and Kid₂-Kis₂-Kid₂-Kis₂ octamer (87 120 Da) (Supplementary Table 1; Figure 6A).

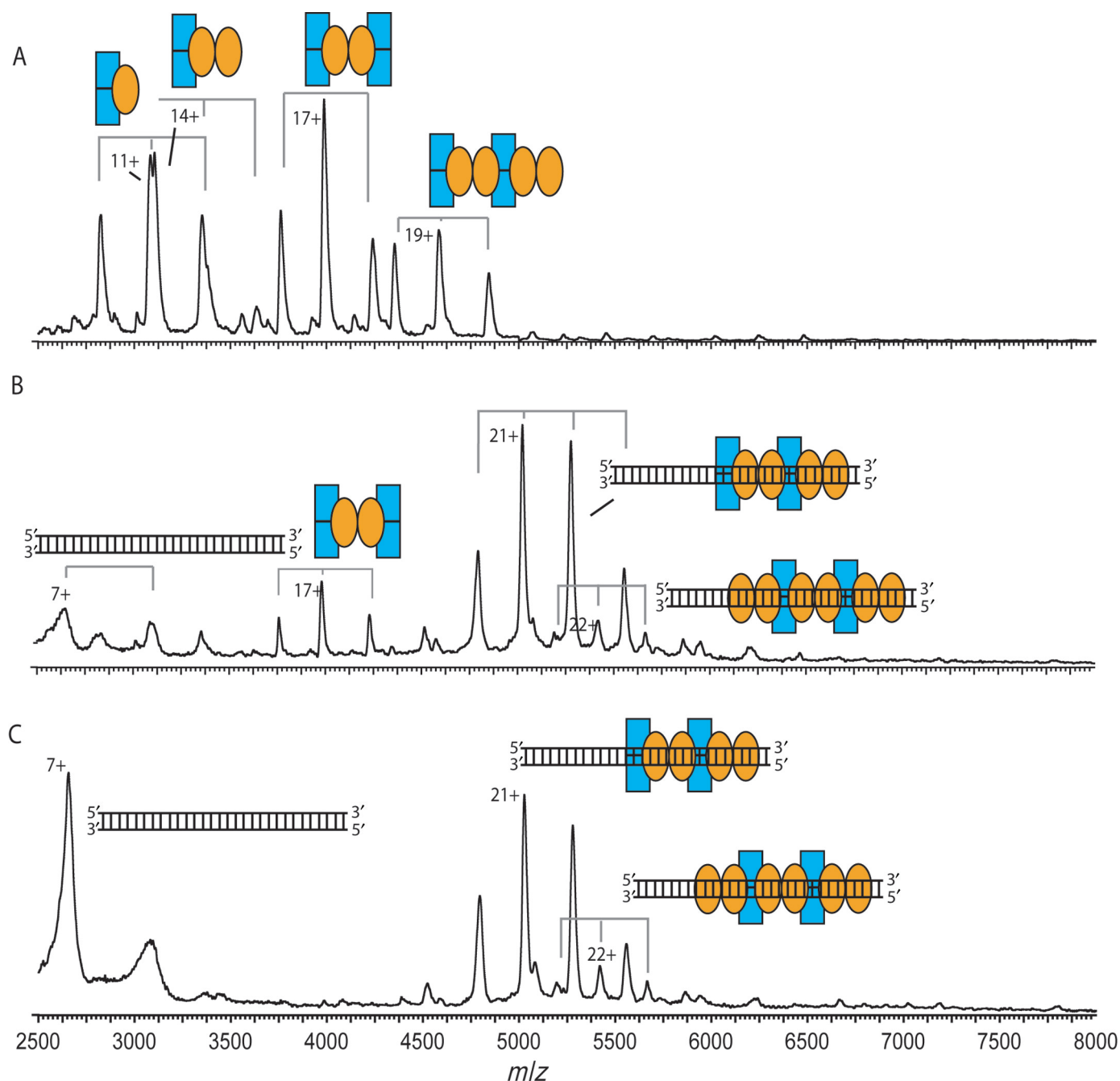


Figure 6. Kid-Kis complexes (molar ratio of 1:1) interact tightly with *parD* region I. Macromolecular native mass spectrometry was performed on Kid-Kis and on Kid-Kis-*parD* DNA complexes in ammonium acetate (50 mM), pH 5.8. (A) Mass spectrum of a mixture of Kid:Kis at a molar ratio of 1:1 (Kis 15 μ M) and (B) and (C) mass spectra of Kid:Kis:*parD* DNA mixtures at molar ratios of 40:40:1 and 10:10:1 (Kis 15 μ M), respectively. Kid and Kis are indicated with blue rectangles and orange ellipses, respectively, and the *parD* DNA fragment with double strand. Each complex is represented by an appropriate combination of rectangles, ellipses and/or DNA double strand. Molecular masses and relative amounts of complexes are shown in Supplementary Tables 1 and 2, respectively.

Upon mixing Kid-Kis mixture with the 30-bp *parD* DNA at a molar ratio of 40:40:1 and subsequent mass spectrometry analysis we observed three ion series (Figure 6B). Mass determination revealed the presence of a low amount of free Kid₂-Kis₂-Kid₂ hexamer (relative abundance of 17%) (67 675 Da) and high amounts of the DNA-bound complexes Kis₂-Kid₂-Kis₂-Kid₂-*parD*

DNA₁ (76%) (105 535 Da) and Kis₂-Kid₂-Kis₂-Kid₂-Kis₂-*parD* DNA₁ (7%) (124 563 Da) complexes (Supplementary Table 2). Thus, the addition of *parD* region I to a 1:1 mixture of Kid and Kis induces a strong cooperative effect between DNA binding and Kid-Kis octamerization. This cooperative effect was even stronger when the concentration of DNA in solution

was increased 4-fold. Under these conditions the free hexamer completely disappeared and the most abundant complex became the $\text{Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-}parD$ DNA₁ complex (relative abundance of 88%) (Figure 6C). We did not observe any other changes in the mass spectrum upon increasing the concentration of *parD* DNA. These data thus clearly demonstrate that increasing the concentration of Kis relative to Kid dramatically enhances the affinity between the DNA and the Kid-Kis complexes.

Upon mixing Kid-Kis mixture with *parD* region I or II at a molar ratio of 40:40:1 or 20:20:1 and subsequent electrophoretic mobility shift analysis complexes with a similar pattern as in mass spectrometry were observed (Supplementary Figure 2). The most abundant complexes cIX and cX may represent hexameric and octameric Kid-Kis in complex with *parD* DNA, respectively. The assays also showed a faster migrating band with low abundance, which may represent the binding of hexameric Kis alone. Consistent with the mass spectrometry data *parD* region I is fully titrated when using a protein:DNA molar ratio of 20:1.

To further define the picture about the effect of the molar ratio of toxin and antitoxin on operator-promoter binding, and thus on their own expression, we added an excess of toxin or alternatively an excess of antitoxin to the $\text{Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-}parD$ DNA₁ complex. In the first experiment, a 2-fold molar excess of Kid over Kis was added to the preformed $\text{Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-}parD$ DNA₁ complex. The resulting mass spectrum showed three ion series corresponding to free DNA, $\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2$ hexamer and $(\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2)_2\text{-DNA}_1$ complex, thus revealing a partial reversion of the binding on the operator due to the excess of toxin over antitoxin. In contrast, the addition of a 2-fold molar excess of Kis over Kid to the $\text{Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-}parD$ DNA₁ complex had no effect on the equilibrium binding of the $\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-Kis}_2$ octamer to the *parD* DNA region I.

Topology of the octameric Kid-Kis-*parD* DNA complex

To further investigate the effect of *parD* DNA binding on the Kid-Kis oligomers, octameric Kid-Kis complexes free and bound to *parD* DNA were analyzed by macromolecular tandem mass spectrometry. The 20⁺ ion of the free octamer (m/z 4127) was isolated by the high-mass quadrupole and subsequently accelerated in the argon-filled collision cell. Already at a low acceleration voltage (35 V) we observed dissociation of the octameric ion into highly charged monomers and moderately charged heptameric complexes (Figure 7A). At low m/z values, two charge-state envelopes were observed corresponding to Kid and Kis monomer, whereas at high m/z values, the corresponding $\text{Kis-Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2$ and $\text{Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2$ heptamer were detected. The relative abundances of the ion peaks showed that dissociation of Kid from the octamer was somewhat favoured.

From the octameric Kid-Kis-*parD* DNA complex we selected the 21⁺ (m/z 5290). At an acceleration voltage of 45 V, the Kid monomer, but not Kis monomer or *parD* region I, started to dissociate from the octamer-*parD* DNA complex (Figure 7B). Also further increasing the

acceleration voltage did not result in dissociation of Kis. Thus, in comparison with free octamer, the dissociation was initiated at an increased acceleration voltage and only Kid dissociated from the DNA bound complex. This not only shows that the DNA bound complex is more stable, but also confirms the direct interaction between Kis and *parD* region I, thereby protecting the protein from dissociation. Such a phenomenon has also been observed by van Duijn *et al.* (30) for GroEL-substrate complexes, for which the substrate molecules are buried within the hydrophobic ring structure of GroEL and do not dissociate upon increasing the acceleration voltage. We did not observe any acceleration voltage-induced covalent fragmentation of *parD* DNA up to voltages of 150 V when bound to Kid-Kis octamer. In contrast, free 30-bp *parD* DNA already fragmented at an acceleration voltage of 25 V (data not shown). This data, therefore, strongly indicates that the DNA tightly interacts with the protein complex.

DISCUSSION

The *parD* operon of plasmid R1 encodes the toxin Kid and the antitoxin Kis. It has been demonstrated that *in vivo* efficient autoregulation of the *parD* operon requires the consorted action of both proteins (20). Recent *in vitro* studies have shown that Kid and Kis can form multiple complexes with different stoichiometries and oligomeric states, depending on the molar ratio between Kid and Kis (18). The $\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2$ hexamer is the most abundant species when Kid exceeds the concentration of Kis, whereas various Kid-Kis complexes are present when the concentration of Kis equals or exceeds the concentration of Kid.

Our DNA binding and mass spectrometry data presented here show that the antitoxin Kis interacts with the *parD* operon with low affinity. These data are in line with previous studies, which have shown that Kis alone is a poor repressor *in vivo* (11). The addition of toxin Kid to Kis enhances the binding affinity with *parD* DNA, however, the tightness of this interaction with *parD* DNA is determined by the molar ratio between Kid and Kis. We demonstrated that when Kid and Kis were mixed in a molar ratio of 2:1, the interaction between the resulting $\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2$ hexamer and the *parD* DNA is weak. Thus, in these conditions transcriptional repression is expected to be limited. On the contrary, when the complex mixture of Kid-Kis oligomers, obtained at an equimolar ratio of Kid and Kis, was added to the *parD* DNA a strong cooperative effect of DNA binding and $\text{Kid}_2\text{-Kis}_2\text{-Kid}_2\text{-Kis}_2$ octamerization was observed and the *parD* DNA interacted tightly to this octamer. We also observed that the addition of extra toxin (up to a 2-fold molar excess of Kid) to the Kid-Kis octamer-*parD* DNA complex weakened the interaction with the DNA. From these data we conclude that different molar ratios of Kid and Kis can either enhance or diminish the *parD* DNA-binding activity of Kis. Therefore, the transcriptional repression of the *parD* operon and thus the expression of Kid and Kis is critically dependent on the

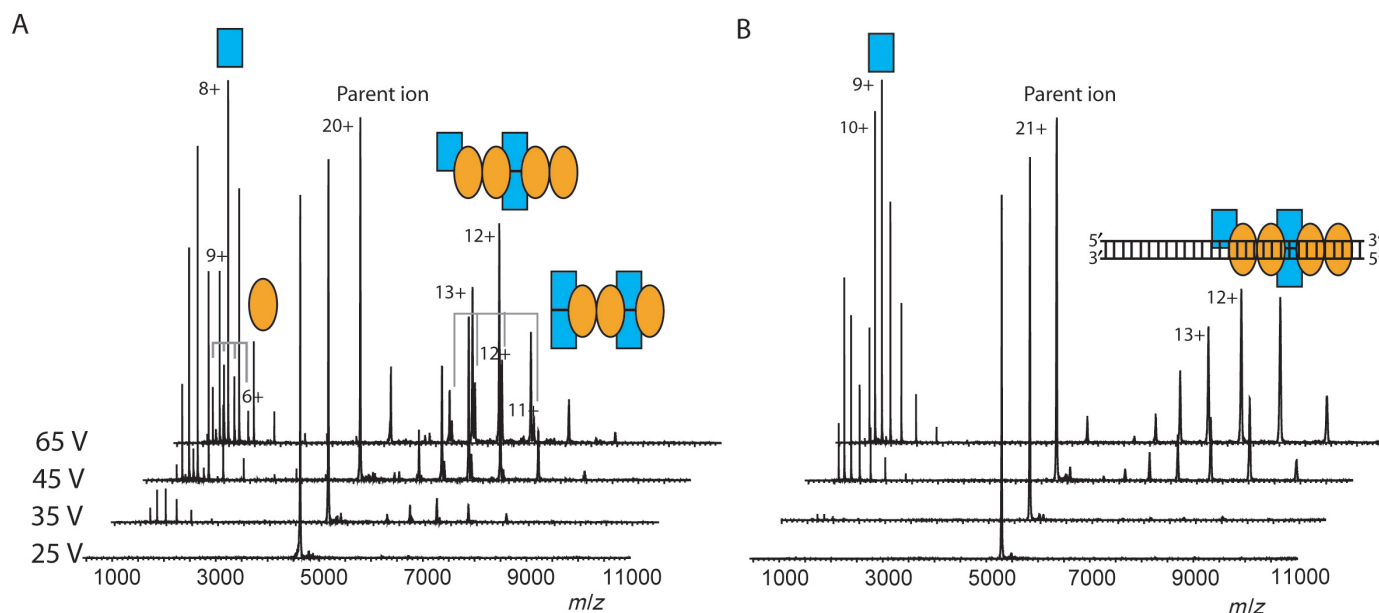


Figure 7. Macromolecular tandem mass spectrometry reveals topology of Kid-Kis-*parD* DNA region I complexes. Tandem mass spectrometry was performed on Kid-Kis and Kid-Kis-*parD* DNA in ammonium acetate (50 mM), pH 5.8. (A) Tandem mass spectra of Kis₂-Kid₂-Kid₂-Kis₂ after selection of the 20⁺ ion and (B) tandem mass spectra of Kis₂-Kid₂-Kid₂-Kis₂-*parD* DNA complex after selection of the 21⁺ ion. Acceleration voltages varied between 25 and 65 V. Kid and Kis are indicated with blue rectangles and orange ellipses, respectively and the *parD* DNA fragment with double strand. Each complex is represented by an appropriate combination of rectangles, ellipses and/or DNA double strand.

molar ratio of Kid and Kis. It should be noted here that the Kid-Kis octamer can interact with the two half-sites of the specific operator region (region I and II) using the two dimers of the antitoxin, whereas the Kid-Kis hexameric can interact with the two half-sites using only one dimer. This is likely to explain the more efficient binding of the octamer. Alleviation of the repression modulated by toxin and antitoxin complexes in excess of the toxin has also been reported for the *ccd* system (25,37) as well as for the *phd-doc* system (15).

Our data also show that Kis and Kid-Kis complexes interact in two imperfect inverted repeats (region I and II). Region I contains an 18-bp symmetric element and region II a pseudo-symmetric element. Moreover, by using separated fragments containing *parD* regions I or II, we found that Kis and Kid-Kis complexes interact with higher affinity to region I. The lower affinity to region II is probably due to the four non-conserved bases in this element (5'-GTTATATTTTATTAAAC-3', in italic non-conserved residues). However, cooperative interactions between regions I and II potentially play an important role in the transcriptional regulation of the *parD* operon.

Are the physical parameters of the Kid-Kis complexes sufficient to form multiple interactions over the full length of the 30-bp *parD* DNA region I? Calculation of the length of the 30-bp *parD* region I and the Kid-Kis octamer, assuming a similar topology as the MazF-MazE hexamer (18,24), revealed lengths of ~100 Å for the DNA and ~150 Å for the Kid-Kis octameric complex. Although no 3D structural model is available for a Kid-Kis-DNA complex or a related toxin-antitoxin-DNA complex, it can be speculated that the octamer can fully cover the

30-bp DNA, which is in line with the DNA footprinting and tandem mass spectrometry data. Very recent nuclear magnetic resonance chemical-shift mapping data have revealed that the antitoxin CcdA alone interacts with duplex DNA comprising a 6-bp palindromic sequence (37). In here, it is also shown that a 33-bp DNA fragment, containing three potential CcdA binding sites, can bind in a cooperate manner with three CcdA dimers. The antitoxins of the *ccd* and *mazEF* systems have amino terminal regions that dimerize to form the DNA-binding region, and contain an unstructured C-terminal part, which interacts with the toxins. The toxins of these systems have also substantial structural homology (24,31), however the N-terminal domains of the CcdA and MazE antitoxin adopt different protein folds. As pointed by these authors, this surprising result confirms the proposal that gene shuffling or partner switching has been important in the evolution of the toxin-antitoxin systems (1).

Our results lead us to propose a model in which the repression of the *parD* operon is tightly regulated by the molar ratio of the toxin and the antitoxin present in the cell (Figure 8). When the level of the toxin exceeds the one of the antitoxin, stable (Kid₂-Kis)_n non-covalent complexes are formed, which are able to completely neutralize Kid lethal activity (M.B. Kamphuis *et al.*, submitted for publication), but do not tightly interact with the *parD* operator-promoter region. On the contrary, when the concentration of Kis is enhanced relative to Kid, such that both proteins have similar concentrations, (Kid₂-Kis₂)_n or (Kid₂-Kis₂-Kid₂-Kis₂)_n oligomers are formed capable of strongly interacting with the *parD* operator-promoter region. These stoichiometric

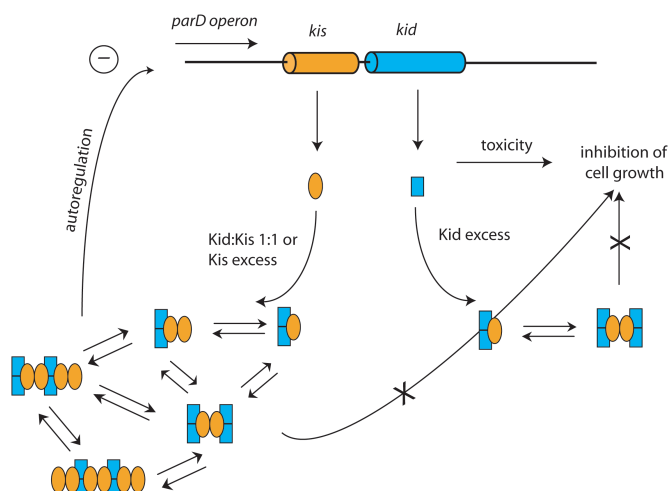


Figure 8. Schematic model of the transcription autoregulation of the *parD* operon. The *kid* gene and the Kid protein in blue and the *kis* gene and the Kis protein in orange. Each protein complex is represented by an appropriate combination of blue rectangles (Kid) and orange ellipses (Kis). Free Kid inhibits cell growth. In conditions in which the concentration of Kid is higher than that of Kis Kid_2-Kis_1 and Kid_2-Kis_2 complexes are formed. These complexes repress ribonuclease activity of Kid, but allow efficient transcription. When the concentration of Kid is equal or lower than that of Kis, mostly 1:1 complexes are formed. These complexes do not only repress the ribonuclease activity of Kid, but also the transcription process.

complexes have a very strong capacity to interact with the specific *parD* sequences and to repress the transcription pathway. When the expression is repressed, no replacement can occur of the labile Kis antitoxin, which is prone to degradation by Lon protease. The level of the toxin will, therefore, exceed the one of the antitoxin. At this stage, the equilibrium between $(Kid_2-Kis_2)_n$ oligomers will shift towards $(Kid_2-Kis)_n$ oligomers, thereby reducing the affinity for the *parD* operon. Subsequently, the inhibition of transcription will be alleviated. The tight interaction with *parD* region I suggests that this region plays a prominent role in the regulation of *parD* repression, however, interactions in region II could be required for fine adjustment in this regulation. As mentioned above, cooperative interactions between the two regions could introduce additional complexity in this regulation. The neutralization of the negative charges of the antitoxin by the toxin may stabilize interaction of the repressor complexes with the DNA. How this particular configuration contributes to the efficient binding of the repressor complex and thus to the fine-tuning of the promoter activity remains to be established.

Similar mechanisms of transcription autoregulation have been proposed for the *ccd* and the *mazEF* addiction systems (23–25,37). Electrophoretic mobility shift assays have shown that multimers of $CcdA_2CcdB_2$ have multiple DNA-binding sites and spirals around the promoter region (25). It has also been proposed that when $CcdB$ is present in a molar excess over $CcdA$, binding of a $CcdB_2$ dimer to a $(CcdB_2-CcdA_2)$ –DNA complex causes steric hindrance and, therefore, loosens the interaction of the protein complex with DNA. This will alleviate the

inhibition of transcription (37). On the other hand, for the *parD* system, the binding of Kis or Kid–Kis complexes to the *parD* operator-promoter region occurs only in two discrete regions (I and II) spaced by 33 bp; the distribution of the specific contacts that Kis and Kid–Kis complexes make on each of the DNA regions are spaced 11–13 bp, indicating that the proteins bind on the same face of the DNA. It should be noted here that $CcdB$ and Kid have different activities: $CcdB$ acts as a toxin and inhibitor for DNA gyrase, an essential enzyme that catalyses negative supercoiling of DNA (4), whereas Kid functions as a ribosome-independent RNase (10,18).

Although no stoichiometric complexes of MazF–MazE on the DNA have been identified, it has been postulated that MazE mediates assembly of heterocomplexes on DNA. The resulting higher order complexes would then form stoichiometric MazF–MazE complexes. In the *mazEF* system, the promoter region contains three antitoxin-binding regions (11–12-bp long) that can form an ‘alternating palindrome’. It has been proposed that MazE antitoxin binds to these sites and that two MazF dimers can bridge the MazE dimers in a highly cooperative interaction (38). The situation in the *kid-kis* system is different in that the promoter region contains two binding regions, I and II, of 18-bp.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data is available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

M.C.M. was supported by a Short Term FEBS Fellowship and R.H.H.vdH. by a VENI fellowship (700.54.402) from the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO). R.D.O. was supported by Project BFU2005-03911 from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC) and by Project PIF 200420F0332 (CSIC) and M.B.K. by the Centre for Biomedical Genetics. We thank the Netherlands Proteomics Centre for financial support. Funding to pay the Open Access publication charge was provided by Netherlands Proteomics Centre.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Anantharaman,V. and Aravind,L. (2003) New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. *Genome Biol.*, **4**, 81.
- Hayes,F. (2003) Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science*, **301**, 1496–1499.
- Gerdes,K., Christensen,S.K. and Lobner-Olesen,A. (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 371–382.
- Bernard,P. and Couturier,M. (1992) Cell killing by the F-plasmid $CcdB$ protein involves poisoning of DNA-topoisomerase-I complexes. *J. Mol. Biol.*, **226**, 735–745.
- Jiang,Y., Pogliano,J., Helinski,D.R. and Konieczny,I. (2002) ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol. Microbiol.*, **44**, 971–979.
- Pedersen,K., Zavialov,A.V., Pavlov,M.Y., Elf,J., Gerdes,K. and Ehrenberg,M. (2003) The bacterial toxin RelE displays

- codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell*, **112**, 131–140.
7. Kamada, K. and Hanaoka, F. (2005) Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Mol. Cell*, **19**, 497–509.
 8. Zhang, Y.L., Zhang, J.J., Hoeflich, K.P., Ikura, M., Qing, G.L. and Inouye, M. (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell*, **12**, 913–923.
 9. Munoz-Gomez, A.J., Santos-Sierra, S., Berzal-Herranz, A., Lemonnier, M. and Diaz-Orejas, R. (2004) Insights into the specificity of RNA cleavage by the *Escherichia coli* MazF toxin. *FEBS Lett.*, **567**, 316–320.
 10. Munoz-Gomez, A.J., Lemonnier, M., Santos-Sierra, S., Berzal-Herranz, A. and Diaz-Orejas, R. (2005) RNase/anti-RNase activities of the bacterial parD toxin-antitoxin system. *J. Bacteriol.*, **187**, 3151–3157.
 11. Ruiz-Echevarria, M.J., Berzal-Herranz, A., Gerdes, K. and Diaz-Orejas, R. (1991) The kis and kid genes of the parD maintenance system of plasmid R1 form an operon that is autoregulated at the level of transcription by the co-ordinated action of the Kis and Kid proteins. *Mol. Microbiol.*, **5**, 2685–2693.
 12. de Feyter, R., Wallace, C. and Lane, D. (1989) Autoregulation of the ccd operon in the F plasmid. *Mol. Gen. Genet.*, **218**, 481–486.
 13. Gronlund, H. and Gerdes, K. (1999) Toxin-antitoxin systems homologous with relBE of *Escherichia coli* plasmid P307 are ubiquitous in prokaryotes. *J. Mol. Biol.*, **285**, 1401–1415.
 14. Tam, J.E. and Kline, B.C. (1989) Control of the Ccd operon in plasmid-F. *J. Bacteriol.*, **171**, 2353–2360.
 15. Magnuson, R. and Yarmolinsky, M.B. (1998) Corepression of the P1 addition operon by Phd and Doc. *J. Bacteriol.*, **180**, 6342–6351.
 16. Bravo, A., Ortega, S., de Torrontegui, G. and Diaz, R. (1988) Killing of *Escherichia coli* cells modulated by components of the stability system ParD of plasmid R1. *Mol. Gen. Genet.*, **215**, 146–151.
 17. Zhang, J., Zhang, Y., Zhu, L., Suzuki, M. and Inouye, M. (2004) Interference of mRNA function by sequence-specific endoribonuclease PemK. *J. Biol. Chem.*, **279**, 20678–20684.
 18. Kamphuis, M.B., Bonvin, A.M., Monti, M.C., Lemonnier, M., Munoz-Gomez, A., van den Heuvel, R.H., Diaz-Orejas, R. and Boelens, R. (2005) Model for RNA binding and the catalytic site of the RNase kid of the bacterial parD toxin-antitoxin system. *J. Mol. Biol.*, **357**, 115–126.
 19. Santos-Sierra, S., Pardo-Abarrio, C., Giraldo, R. and Diaz-Orejas, R. (2002) Genetic identification of two functional regions in the antitoxin of the parD killer system of plasmid R1. *Fems Microbiol. Lett.*, **206**, 115–119.
 20. Lemonnier, M., Santos-Sierra, S., Pardo-Abarrio, C. and Diaz-Orejas, R. (2004) Identification of residues of the kid toxin involved in autoregulation of the parD system. *J. Bacteriol.*, **186**, 240–243.
 21. Ruiz-Echevarria, M.J., de la Cueva, G. and Diaz-Orejas, R. (1995) Translational coupling and limited degradation of a polycistronic messenger modulate differential gene expression in the parD stability system of plasmid R1. *Mol. Gen. Genet.*, **248**, 599–609.
 22. de la Cueva-Mendez, G., Mills, A.D., Clay-Farrace, L., Diaz-Orejas, R. and Laskey, R.A. (2003) Regulatable killing of eukaryotic cells by the prokaryotic proteins Kid and Kis. *EMBO J.*, **22**, 246–251.
 23. Dao-Thi, M.H., Charlier, D., Loris, R., Maes, D., Messens, J., Wyns, L. and Backmann, J. (2002) Intricate interactions within the ccd plasmid addition system. *J. Biol. Chem.*, **277**, 3733–3742.
 24. Kamada, K., Hanaoka, F. and Burley, S.K. (2003) Crystal structure of the MazE/MazF complex: Molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol. Cell*, **11**, 875–884.
 25. Afif, H., Allali, N., Couturier, M. and Van Melder, L. (2001) The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the ccd poison-antidote system. *Mol. Microbiol.*, **41**, 73–82.
 26. Hanson, C.L. and Robinson, C.V. (2004) Protein-nucleic acid interactions and the expanding role of mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **279**, 24907–24910.
 27. van den Heuvel, R.H.H., Gato, S., Versluis, C., Gerbaux, P., Kleenhou, C. and Heck, A.J.R. (2005) Real-time monitoring of enzymatic DNA hydrolysis by electrospray ionization mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 96.
 28. Sharon, M., Taverner, T., Ambroggio, X.I., Deshaies, R.J. and Robinson, C.V. (2006) Structural organization of the 19S proteasome Lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol.*, **4**, e267.
 29. van den Heuvel, R.H.H., van Duijn, E., Mazon, H., Synowsky, S.A., Lorenzen, K., Versluis, C., Brouns, S.J.J., Langridge, D., van der Oost, J. et al. (2006) Improving the performance of a quadrupole time-of-flight mass spectrometer for macromolecular mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **78**, 7473–7483.
 30. van Duijn, E., Simmons, D.A., van den Heuvel, R.H.H., Bakkes, P.J., van Heerikhuizen, H., Heeren, R.M.A., Robinson, C.V., van der Vies, S.M. and Heck, A.J.R. (2006) Tandem mass spectrometry of intact GroEL-substrate complexes reveals substrate-specific conformational changes in the trans ring. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 4694–4702.
 31. Hargreaves, D., Santos-Sierra, S., Giraldo, R., Sabariego-Jareno, R., de la Cueva-Mendez, G., Boelens, R., Diaz-Orejas, R. and Rafferty, J.B. (2002) Structural and functional analysis of the Kid toxin protein from E-coli plasmid R1. *Structure*, **10**, 1425–1433.
 32. Tahallah, N., Pinkse, M., Maier, C.S. and Heck, A.J. (2001) The effect of the source pressure on the abundance of ions of noncovalent protein assemblies in an electrospray ionization orthogonal time-of-flight instrument. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 596–601.
 33. Sobott, F., Hernandez, H., McCammon, M.G., Tito, M.A. and Robinson, C.V. (2002) A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies. *Anal. Chem.*, **74**, 1402–1407.
 34. Videler, H., Ilag, L.L., McKay, A.R.C., Hanson, C.L. and Robinson, C.V. (2005) Mass spectrometry of intact ribosomes. *FEBS Lett.*, **579**, 943–947.
 35. Benesch, J.L.P., Aquilina, J.A., Ruotolo, B.T., Sobott, F. and Robinson, C.V. (2006) Tandem mass spectrometry reveals the quaternary organization of macromolecular assemblies. *Chem. Biol.*, **13**, 597–605.
 36. Garner, M.M. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions - application to components of the *Escherichia coli* operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3047–3060.
 37. Madl, T., van Melder, L., Mine, N., Responsdek, M., Oberer, M., Keller, W., Khatai, L. and Zangger, K. (2006) Structural basis for nucleic acid and toxin recognition of the bacterial antitoxin CcdA. *J. Mol. Biol.*, **364**, 170–185.
 38. Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M.H., Wyns, L. and Loris, R. (2005) Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 672–679.

REVIEW ARTICLE

***parD* toxin–antitoxin system of plasmid R1 – basic contributions, biotechnological applications and relationships with closely-related toxin–antitoxin systems**

Elizabeth Diago-Navarro¹, Ana M. Hernandez-Arriaga¹, Juan López-Villarejo¹, Ana J. Muñoz-Gómez¹, Monique B. Kamphuis², Rolf Boelens², Marc Lemonnier³ and Ramón Díaz-Orejas¹

¹ Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Molecular Microbiology and Infection Biology, Madrid, Spain

² NMR Department, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

³ ANTABIO SAS, Incubateur Midi-Pyrénées, Toulouse, France

Keywords

bacterial RNases, gene regulation, Kid toxin and Kis antitoxin, *parD* operon, plasmid maintenance, plasmid R1, toxin–antitoxin systems, translation inhibition

Correspondence

R. Díaz-Orejas, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Molecular Microbiology and Infection Biology, Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid, Spain
Fax: +3491 5360432
Tel: +3491 8373112
E-mail: ramondiaz@cib.csic.es

(Received 1 March 2010, revised 21 May 2010, accepted 27 May 2010)

doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07722.x

Toxin–antitoxin systems, as found in bacterial plasmids and their host chromosomes, play a role in the maintenance of genetic information, as well as in the response to stress. We describe the basic biology of the *parD/kiskid* toxin–antitoxin system of *Escherichia coli* plasmid R1, with an emphasis on regulation, toxin activity, potential applications in biotechnology and its relationships with related toxin–antitoxin systems. Special reference is given to the *ccd* toxin–antitoxin system of plasmid F because its toxin shares structural homology with the toxin of the *parD* system. Inter-relations with related toxin–antitoxin systems present in the *E. coli* chromosome, such as the *parD* homologues *chpA/mazEF* and *chpB* and the *relBE* system, are also reviewed. The combined structural and functional information that is now available on all these systems, as well as the ongoing controversy regarding the role of the chromosomal toxin–antitoxin *loci*, have made this review especially timely.

The discovery of plasmid maintenance systems: a round trip to bacterial physiology through molecular biology

Introduction

Plasmids are extrachromosomal genetic elements that multiply in bacteria in pace with the chromosome. DNA copying normally initiates from a fixed and unique position, the origin of replication, and continues by a process using the same enzymatic machinery that replicates the host chromosome. Plasmids contribute to their replication and maintenance by providing

a *trans*-acting factor (usually an initiation protein), which is dispensable in a few systems, and the so-called copy number control genes that couple plasmid replication to the cell cycle of the host. These genes monitor and correct the frequency of initiation, maintaining a constant average number of copies per cell. The regulation of plasmid copy number represents the first level of maintenance of these genetic elements in bacteria [1,2].

In addition to the replication control genes, plasmids may contain one or a combination of three possible auxiliary maintenance systems [3]. The common signature of these systems is that they are dispensable for

Abbreviations

EMSA, electrophoretic mobility shift assay; IR, inverted repeat; LHH, looped-hinge-helix; PDB, Protein Data Bank; RHH, ribbon-helix-helix; TA, toxin–antitoxin.

plasmid replication and that they do not influence the plasmid copy number [4]. Maintenance systems of the first type, known as a partition systems, actively distribute these copies at the onset of cell division, preventing the plasmid loss that could result from random distribution, particularly when the copy number is low. The second type of maintenance system uses site-specific recombination to resolve plasmid multimers originated by homologous recombination, thus preventing the clustering of the plasmid pool and making the individual copies available for their distribution at cell division.

Maintenance systems of the third type [i.e. the so-called 'postsegregational killer systems' or toxin-antitoxin (TA) systems] are based, with few exceptions, on two genes, one encoding a toxin and the other an antitoxin, which are expressed at a low level. The toxin is neutralized in cells containing the plasmid by continuous production of the antitoxin. However, because the toxin is longer-lived than the antitoxin, when the plasmid is lost from the cell, the antitoxin decays faster than the toxin, leaving the toxin free to kill or to inhibit the growth of the cells [5–8]. By eliminating plasmid free segregants, TA systems behave as addition modules that efficiently contribute to the persistence of plasmid-containing cells in microbial populations [9]. Furthermore, plasmids carrying TA systems are maintained preferentially with respect to their competition with other replicons devoid of these cassettes [10]. Indeed, this selective maintenance is proposed to have played an important role during early evolution in the microbial world [11].

Maintenance of plasmid R1: basic and auxiliary stability modules

The R1 plasmid of *Enterobacteria*, one of the first antibiotic resistance factors identified in bacteria living in the gut/bowel of mammals, is one of the plasmids that has contributed in a pioneering way to our knowledge of basic and auxiliary plasmid maintenance systems (Fig. 1) [1]. A key discovery that opened the way to the genetic analysis of replication control in bacteria was the isolation of high copy number plasmid mutants of plasmid R1, as reported in 1972 by Nordström *et al.* [12]. Subsequently, Nordström's team discovered and characterized a plasmid region, the so-called 'basic replicon', which includes the copy number control genes, *copA* and *copB*, the gene of the replication initiation protein, *repA*, and the origin of replication *oriR1* (Fig. 1B) [13]. Copy number control genes couple the replication of the plasmid to cell growth, determine an average copy number of the plas-

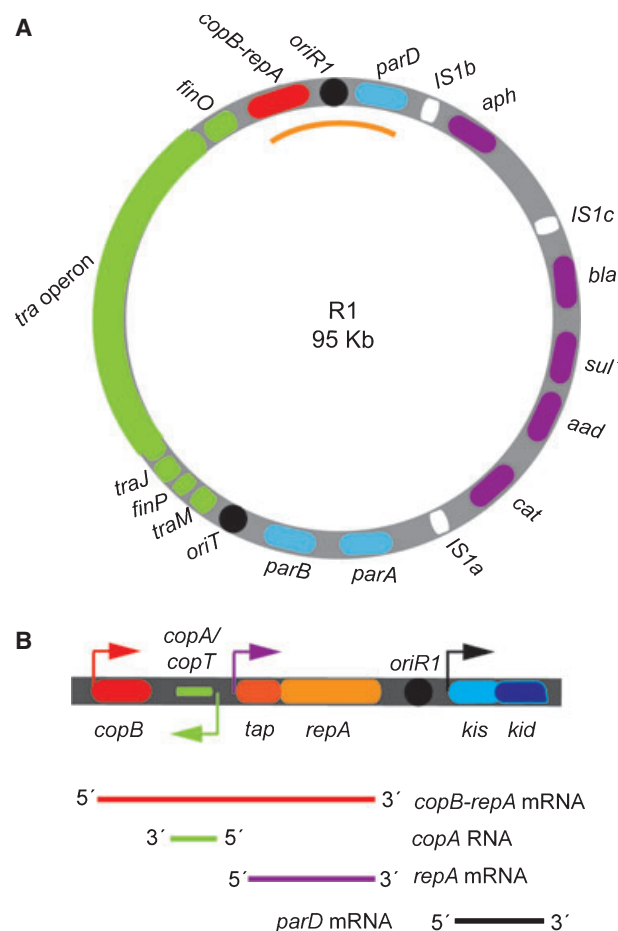


Fig. 1. Map showing the significant regions of the R1 antibiotic resistance factor. (A) R1 schema showing genes involved in replication (red), maintenance (blue), antibiotic resistance (purple), conjugation (green), origins of replication and transfer (black) and insertion sequences (IS) flanking the antibiotic resistance determinants (white). (B) An expanded view of the region coloured orange in (A). This region contains the basic replicon, which includes the origin of replication (*oriR1*), the gene of the replication initiation protein (*repA*), the gene of the translation adaptor protein (*tap*) needed for efficient RepA translation, the copy number control genes (*copA*, *copB*) and the adjacent TA *parD* system (*kis*, *kid*). Coloured arrows indicate promoter regions. Similar-coloured lines indicated the transcripts corresponding to the activity of those promoters.

mid, correct possible deviations on this average and, jointly with the specific machinery of the host, promote the autonomous replication of the plasmid. The stability of the plasmid is related to its replication and copy number, and therefore the basic replicon can be considered as the basic maintenance system of the plasmid.

In addition, this group discovered two of the three R1 auxiliary maintenance locus: *parA* and *parB* (Fig. 1A) [14]. The combined action of both systems increases the stability of the plasmid by four orders of magnitude. *parA*, a partitioning system, contributes

Table 1. Summary of the main TA systems.

TA operon	Toxin	Antitoxin	Localization	Toxin homologies ^a	Antitoxin homologies ^b
<i>parD(pem)</i> [18,20]	Kid (PemK)	Kis (PemI)	R1/R100 plasmid	CcdB/ChpAK/ChpBK [65]	ChpAI/MazE/AbrB (LHH domain) [54]
<i>ccd</i> [19]	CcdB	CcdA	F1 Plasmid	Kid/ChpAK/ChpBK [65,67]	MetJ, Arc, ParD (RHH domain) [76,77,80,81]
<i>chpA</i> (<i>mazEF</i>) [39]	ChpAK (MazF)	ChpAI (MazE)	<i>E. coli</i> chromosome	PemK (Kid)/ChpBK/CcdB [39,54]	AbrB (LHH domain) [54]
<i>chpB</i> [39]	ChpBK	ChpBI	<i>E. coli</i> chromosome	PemK (Kid)/ChpAK/CcdB [39]	PemI (Kis)/ChpAI [39]
<i>relBE</i> [137]	RelE	RelB	<i>E. coli</i> chromosome	RNase T1 [22]	MetJ, Arc (RHH domain) [138]
<i>parDE</i> [139]	ParE	ParD	RK2/RP4 plasmid	RelE [54]	CcdA (RHH domain) [78,80,81]
<i>hipBA</i> [140]	HipA	HipB	<i>E. coli</i> chromosome	CDK2/ cyclin A [141]	Xre family (HTH domain) [141]
<i>parB^c</i> [14]	Hok	Sok	R1 plasmid	Gef, RelF, FlmA, SrnB, PndA [142]	–

^a Toxin homologies refer to proteins sharing a similar structure or amino acid sequence. ^b Antitoxin homologies refer to antitoxins or DNA binding domains of regulatory proteins sharing similar structural folds. ^c Type I TA system: the antitoxin Sok is an unstable antisense RNA and the Hok is a transmembrane toxic protein. The identity between the *parD–pem* and *chpA–mazEF* systems or their proteins is indicated in parenthesis.

actively to the nonrandom distribution of the plasmid copies at cell division [4,15], whereas the *parB* locus (the *hok–sok* system) is a TA stability system that kills plasmid-free segregants (Table 1) [5]. The toxin of this system, Hok, is a protein that interferes with membrane potential and its antitoxin, Sok, is an unstable antisense RNA that represses expression of *hok*. Decay of the antisense leads to the activation of the toxin in plasmid-free segregants. This system was the first member of the type I TA systems to be described where the antitoxin is an RNA antisense that represses the expression of the toxin at the post-transcriptional level [16,17]. A reference to the components of the main TA systems described in the present review and their homologies is provided in Table 1.

A second TA system of R1 that is close to the basic replicon of this plasmid was later found in our laboratory: the *parD* locus (containing *kis* and *kid* genes) (Fig. 1 and Table 1) [18]. *parD* belongs to type II TA systems in which its antitoxin Kis, in contrast to *parB* antisense RNA, is an unstable protein that neutralizes directly the activity of the toxin, Kid. Together with *ccd* of the F plasmid, the first TA system described [19], *parD* of plasmid R1 established the early history of bacterial type II TA systems. In this review, we focus on *parD* of R1 and the *ccd* system of F whose toxins belong to the same superfamily. We often refer to the *pem* system, which is identical to *parD* of R1 and was identified in plasmid R100 [20], and to the homologous TA systems *chpA* (*mazEF*) and *chpB* found in the *Escherichia coli* chromosome (Table 1). Reference is also made to the contributions of the *relBE* TA system with respect to our understanding of the activity and function of the *parD* system. The basic

structural information on all these systems and their functional relationships with the *parD* system make this account especially timely. There are several excellent reviews available that provide a more general perspective on type II TA systems [8,21–26] as well as on global bioinformatics analyses [27,28].

The *parD* (*kis*, *kid*) TA system of plasmid R1: identification and first characterization

The *parD* (*kis*, *kid*) system of R1 remained initially undetected as a stabilization module as a result of its low efficiency. Indeed, we discovered this system by serendipity when attempting to isolate conditional replication mutants of a low-copy number R1-miniplasmid devoid of the auxiliary *parA* and *parB* (*hok–sok*) maintenance systems. The system was discovered by the isolation of a plasmid mutation that inhibited cell growth at 42 °C and that dramatically enhanced the stability of the plasmid at 30 °C without increasing its copy number [18]. Because the R1-miniplasmid did not contain other auxiliary stability systems, this phenotype indicated that the mutation activated a novel plasmid stability system. Complementation and sequence analyses mapped the mutation in a short ORF, located close to the basic replicon of the plasmid, which coded for a protein of 10 kDa (Fig. 1B). The mutation, a single amino acid change in the amino terminal region of the protein, led to increased levels of this protein and also of a 12 kDa protein encoded by an adjacent ORF. This indicated that the 10 kDa protein was a regulator of an operon of two genes, which we called *parD*. In addition to derepressing the *parD* operon, the mutation also led to inhibition of cell growth. This

second phenotype was more obvious in rich medium, particularly at high temperatures, and was relieved by mutations in the ORF of the 12 kDa protein that restored the efficient growth of the cells. Thus, it was concluded that the 12 kDa protein was a toxin and, conversely, that the 10 kDa protein, in addition to being a regulator, was its antitoxin. We called the antitoxin gene *kis* (killer suppressor) and the toxin gene *kid* (killing determinant). A mutation that truncated the antitoxin provided results that confirmed this TA assignment [29].

The role of the *parD* system: connection between *parD* and the efficiency of plasmid replication

Under standard conditions, the low stabilization mediated by the *parD* wild-type system went unnoticed but, once discovered, its stabilization could be detected in different related assays: (a) a R1-mini-plasmid carrying a deletion of the system was slightly less stable than the parental replicon and (b) the *parD* wild-type system increased (in *cis* but not in *trans*) the stability of a mini-F replicon devoid of its partitioning system [18]. In a related analysis, this TA system was shown to increase the stability of a thermosensitive pSC101 replicon at high temperature [30]. Using a similar approach, the stability potential of the *parD* system was compared with that of the *ccd* system of plasmid F, as well as that of the *parDE* TA system of plasmid RK2/RP4 and *hok-sok* of plasmid R1. In this analysis, a resident mini-R1 plasmid carrying one of these systems was displaced from the cells following the expression in *trans* of the main inhibitor of plasmid R1 replication: the antisense RNA CopA (Fig. 1B) [31] and the stability of the TA recombinants was compared with the one of the empty vectors. The analysis showed that *parDE* and *hok-sok* systems stabilized the plasmid by more than 100-fold, whereas the stabilization mediated by *ccd* and *parD* was ten-fold lower. Furthermore, the stabilization mediated by *parD* of R1 was associated with an inhibition of growth in cells without plasmid rather than with their apparent death, as was the case in segregants of the *ccd* and *parDE* recombinants. This was the first report of a TA system toxin producing a bacteriostatic effect rather than an apparent bactericidal effect as observed previously [32].

Paradoxically, further information on the role of the wild-type *parD* system came from an analysis of the inactive mutants of this system. It was found that the presence of a functional *parD* operon interfered with the isolation of conditional replication mutants of plasmid R1 [33]. By inactivating the toxin gene, *kid*,

and therefore the system, it was possible to readily isolate this type of mutant. In this way, the first mutant of the *repA* gene coding for the essential replication protein of the plasmid was isolated [33]. Later, a correlation was found between the efficiency of plasmid replication and the activity of the *parD* system: a reduction in the efficiency of plasmid R1 replication increased the transcription of the *parD* wild-type system, interfered with cell growth, and led to a partial recovery in the efficiency of plasmid replication [34]. This indicated that the wild-type *parD* system is derepressed and the toxin is activated by defective replication, and that this activation is able to recover the efficiency of plasmid replication. The mechanism responsible for derepression of the system and activation of the toxin under these circumstances remains to be determined. Subsequently, it was found that the recovery in the efficiency of plasmid replication was related to a reduction in the levels of the CopB copy number controller mediated by the RNase activity of the Kid toxin on the polycistronic *copB-repA* mRNA. This results in activation of a second *repA* promoter that is negatively controlled by CopB as well as in an increase of the RepA levels that recovers the efficiency of replication and the copy number of the plasmid (see below) [35]. The *parD* system appears to monitor the efficiency of plasmid replication and, analogous to a guardian of this process, is activated when this efficiency falls below a certain level, thus enhancing the plasmid replication efficiency. The functional connexion between the basic replicon module and the auxiliary *parD* stability system in plasmid R1 challenged the concept of the independent nature of these plasmid maintenance modules.

The *pem* TA system of plasmid R100 and its homologues in the *E. coli* chromosome

In 1988, Tsuchimoto *et al.* [20] reported their discovery of a TA system identical to *parD* (called *pem*) in plasmid R100, comprising an antibiotic resistance factor that is similar to R1 (Table 1). The perfect conservation of the TA sequences in the two plasmids was rather surprising because the R1 and R100 sequences diverge elsewhere: in their origins of replication, in the essential *rep* gene encoding the initiation protein and in the copy number control gene *copB* [36]. Studies of *pem* have contributed to our understanding of important aspects of the autoregulation of the operon. In particular, Tsuchimoto and Ohtsubo [37] described the interaction of fusion variants of the proteins of the system with the *pem* promoter-operator region, implicating the need for both proteins in transcriptional

regulation of the operon. The same group reported the involvement of a cellular protease called Lon in the activation of the PemK (Kid) toxin, suggesting that it was the consequence of the inactivation of the PemI (Kis) antitoxin by this protease [38].

Two functional systems homologous to *pem/parD* [called *chpA* and *chpB* (*chromosomal homologous of pem*)] were also discovered located in the chromosome of *E. coli* [39] (Table 1). The ability of ChpAI and ChpBI antitoxins to neutralize the Kid toxin [40,41], even if they do so inefficiently, demonstrated the functional relationship between these two chromosomal systems and *pem/parD* and, together with structural information on free or bound toxin and antitoxin proteins obtained by X-ray crystallography and NMR spectroscopy (see below), indicated a common origin for these TA systems.

Other members of this family were later found in the chromosomes of many Gram-positive and Gram-negative bacteria [21,42], often in multiple copies. More recently, a member of this family was also reported in *Archaea* [28].

Roles of chromosomal TA systems

The discovery of *chpA* (*chpAI*, *chpAK*) and *chpB* (*chpBI*, *chpBK*) TA systems in the bacterial chromosomes raised the question of their role in this new context. Genes of the *chpA* system were previously identified as a part of the *relA* operon: the *chpAI* gene *mazE* [43]. *chpA* and *chpB* operons lie close to two genes (*relA* and *ppa*, respectively) that are involved in the synthesis and metabolism of guanosine tetraphosphate (ppGpp), which is responsible for the complex adaptation of cells to low nutrient levels (i.e. the stringent response). It was thus suggested that they might be involved in regulating cell growth [39]. The stringent response elicited by ppGpp involves shutting down stable RNA synthesis as well as the selective expression of particular genes that adjust cell metabolism to the nutritional stress situation.

It was proposed that, under extreme starvation conditions, activation of MazF/ChpAK toxin, whose gene is adjacent to *mazE/chpAI*, leads to death in a part of the population that could enable the survival of the remaining cells (altruistic cell death) [24,44]. How does this activation occur? It might involve the increased repression of *mazEF* (*chpA*) transcription associated with the increased intracellular levels of ppGpp synthesized in response to nutritional stress. Because of the lower stability of the MazE antitoxin compared to that of the MazF toxin [44], it has been proposed that faster decay of MazE leaves MazF

toxin free to kill the cells. The relevance of ppGpp in this activation was highlighted by the identification of a regulator of ppGpp levels, MazG, whose gene forms part of the *mazEF* operon [45]; MazG limits the deleterious effect of MazF toxin by downregulating ppGpp levels, thus decreasing the operon repression. Furthermore, a quorum sensing signal, EDF or extracellular death factor, is produced at high cell densities that could activate cell death mediated by *mazEF* [46,47]. Interestingly it was found that cell death mediated by the solitary MazF-like toxin of *Myxococcus xanthus* contributes to the body fruit formation of this singular microorganism. In this case, the *mazFmx* gene is integrated and its activity is regulated within the network that controls this multicellular developmental programme [48]. However, some of the basic predictions of the programmed cell death hypothesis have not been independently validated and remain to be confirmed [49–52].

An alternative role for the activation of the toxins of chromosomal TA systems has been proposed by Gerdes [49], namely to downregulate essential and costly biosynthetic pathways, thus activating a process in which cells, rather than dying, enter a latent state from which they can recover under favourable conditions. The detailed analysis of the Lon-dependent activation of the *relBE* system by nutrient deprivation further supports this proposal [21]. This alternative role implies a bacteriostatic effect of the toxin, at least during a certain time after its activation. Cell growth inhibition under nutrient limiting conditions is a result of the inhibition of protein synthesis mediated by the inactivation of the ribosomes because of cleavage of mRNA on the ribosome by the RelE toxin (see below); this inhibition can be reversed by the action of the antitoxin and the *trans*-translation reaction mediated by tmRNA that rescues stalled ribosomes containing nonstop mRNAs by adding a proteolysis-inducing tag to the unfinished polypeptide chain, and enabling the degradation of the nonstop mRNA [21,50,53]. A similar profile of growth and protein synthesis inhibition has been reported for the toxins of chromosomal homologues of the *parD* system [50]. TA systems could play a role in quality control during protein synthesis because it should reduce mistranslation associated with limitations in the pool of charged tRNAs [21]. A relation between bacterial TA systems and the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system has been suggested [23,54,55]. The recovery by the antitoxin of cultures arrested by the toxin has indeed also been reported for the *parD* system [56; E. Diago-Navarro, unpublished results]. The dormant state induced by the same TA system, notably HipBA, has been shown to

favour survival under stress, particularly antibiotic stress, resulting in an increased level of the persistence phenotype [57].

Although response to stress is emerging as a main role of chromosomal TA systems, additional roles have been proposed, such as the stabilization of particular chromosomal regions or the anti-addiction of incoming plasmid containing similar TA systems [58]. A more detailed discussion of these topics is provided in a recent review [26].

The pivotal role of structural biology in unravelling the mode of action of TAs

The homologies between *parD* and *ccd* systems

The relationships between Kid and CcdB

ccd of F plasmid discovered by Ogura and Hiraga [19] was the first report of a type II TA system. As for *parD*, the *ccd* system contains antitoxin and toxin genes organized in an operon [19] and it acts post-segregationally by killing plasmid-free segregants [59]. The toxin, CcdB, inactivates DNA gyrase by targeting the subunit A of this topoisomerase [32,60,61]. The dimer of CcdB in complex with GyrA freezes the enzymatic cycle of DNA gyrase at a stage when the DNA strands are cleaved, which leads to DNA lesions and, ultimately, cell death [62]. Kid toxin instead acts as an endoribonuclease (see below). The functional differences between both toxins had already been revealed in an early comparative study [64]. The analyses indicated that the toxins of these systems behave differently: only the toxin of the *ccd* system could trigger the SOS response and induce lytic propagation of the

λ prophage, probably as a consequence of the induced DNA lesions. By contrast, Kid toxin was unable to induce the SOS response and failed to induce the λ prophage [63] most probably as a consequence of its primary RNase activity (see below). The similarity of the sequences of both toxins is only 11%, which is consistent with their functional differences [64,65].

Despite these differences, structural analysis indicated that the toxins of both systems are related. The crystal structure of the Kid toxin was reported in 2002 [65]. Kid is a dimer both in solution as well as in the crystal structure in which the monomers are related by two-fold symmetry (Fig. 2A,C). The structure of each monomer is dominated by eight β -strands and a twelve residue C-terminal α -helix. The β -strands are arranged as a sheet formed by a five-stranded twisted antiparallel sheet plus a small three-stranded antiparallel β -sheet inserted in the main sheet. Two additional α -helices, of seven and three residues, and an N-terminal hairpin complete the structural elements of the monomer. In the dimer, the hairpin loop at the N-terminal region of each monomer is linked to the second monomer by a salt bridge between Glu18 and Arg85, which orients this loop (Fig. 2A). Mutation in these residues on the one hand enhances the fluorescence of the internal Trp residue of the toxin, indicating a local distortion in the structure and, on the other hand, inactivates growth inhibition by the toxin. This strongly suggests that both a dimeric Kid and a proper orientation of the amino terminal loop are required for a functional toxin [66]. All these predictions are consistent with the known structure of the toxin, a specific endoribonuclease, in complex with an RNA substrate or with the Kis antitoxin (see below); residues of the two Kid

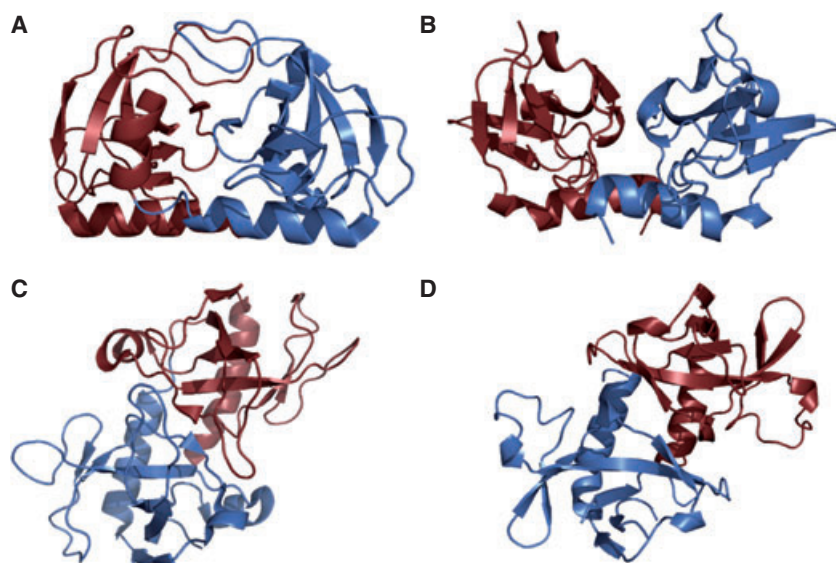


Fig. 2. Different views of the ribbon representation of the crystal structures of Kid and CcdB dimeric toxins. (A, C) Showing the dimeric Kid toxin [Protein Data Bank (PDB) code: 1M1F] [65]. (B, D) Showing the equivalent views for CcdB toxin (PDB code: 1VUB) [67]. Monomers in the dimers are coloured ruby and marine blue. Generated with PYMOL, version 0.99rc6 [135].

monomers are involved in RNA binding, and disruption of the orientation of the amino terminal hairpin by the C-terminal tail of the antitoxin inactivates the toxicity of the protein.

The crystal structure of CcdB, the first known type II toxin, was reported in 1999 [67] (Fig. 2B,D). As in the Kid toxin, there are eight β -strands, five of them arranged in antiparallel orientation forming a main β -sheet in which a minor β -sheet formed by three antiparallel β -strands is inserted. An extended α -helix is located at the C-terminal region. CcdB as Kid also contains a hairpin at the N-terminal region.

The fact that CcdB and Kid bind to different targets (DNA gyrase and RNA, respectively) is also reflected by differences in the structure of these toxins. The orientation of the α -helices and the size of the N-terminal hairpins, as well as the charge distribution, differs in Kid and CcdB toxins. Residues involved in toxicity, as identified by genetic analysis, also lie in different regions. Interactions of CcdB with the dimerization domain of GyrA are accompanied by extensive rearrangement affecting the tower and the catalytic domains of this dimeric subunit of DNA gyrase [68]. Arg462 of GyrA, which is located in the dimerization domain and DNA exit gate of GyrA, plays a key role in the interaction. Three terminal residues of CcdB (Trp99, Gly100 and Ile101) play an essential role in the toxicity of this protein [69]. The three C-terminal residues are in close proximity to Arg462 of the exit gate and dimerization region of the GyrA protein. This residue (which interacts with Trp99 of CcdB) when mutated (R462C, R462S, R462A) was found to prevent the binding of CcdB to GyrA and to confer resistance to the action of the toxin [32,70,71]. By contrast to CcdB, the RNase activity mediated by Kid requires charged residues that lie close to the interface of the two subunits of the protein dimer (Asp75, Arg73, His17), as well as residues that bridge the two monomers and contribute to the orientation of the amino terminal hairpins (Glu18-Arg85). Mutations in these residues disrupt either the active site of Kid or its binding to the RNA substrate, thus abolishing or greatly affecting its toxicity (see below).

The Kis and CcdA antitoxins

The antitoxins of the *parD* and *ccd* systems (Kis and CcdA, respectively), although not belonging to the same superfamily, share significant homology in their amino and carboxy terminal regions [64]; these regions are involved in the regulation and neutralization of the toxins, respectively [72–74]. In both antitoxins, interactions between the amino terminal regions form the

core of the dimer and the DNA binding domain (Table 1). The N-terminal region of Kis shows a defined secondary structure containing four β -strands, one α -helix and a helical turn [75], resembling the secondary structure of the MazE antitoxin, which contains a looped-hinge-helix (LHH) fold similar to the AbrB family [54]. The N-terminal region of CcdA shows, in contrast to Kis and MazE antitoxins, a ribbon-helix-helix (RHH) fold [76,77]. The same RHH fold has been found in the dimeric structure for the N-terminal part of ParD antitoxin of the *parDE* TA system of plasmid RK2/RP4 as determined by NMR spectroscopy by Oberer *et al.* [78], and also in the homologous antitoxin ParD found in *Caulobacter crescentus* [79]. This fold is a DNA-binding motif found in prokaryotic repressors such as MetJ and Arc repressor [80,81]. Using NMR spectroscopy, isothermal titration calorimetry and mutation analysis, Madl *et al.* [82] found that CcdA specifically recognizes a 6 bp palindromic DNA sequence within the operator–promoter region of the *ccd* operon and that CcdA binds to DNA by insertion of the positively charged N-terminal β -sheet into the major groove, positioned similarly to that for the MetJ and Arc repressors [83].

In the absence of its binding partner Kid, the C-terminal region of Kis shows, apart from one α -helix and a helical turn, a mainly unstructured C-terminal region [75], which can tightly interact with and inactivate toxin dimers (see below). The disordered C-terminal region is also found in CcdA and ParD antitoxins of plasmids F and RK2/RP4 [78,82] but, interestingly, this region appears to be structured in other antitoxins such as ParD of *C. crescentus* and YefM of *Mycobacterium tuberculosis* [79,84]. Interestingly, YefM of *E. coli* was found to be unstructured [85].

TA interactions: structural information and functional implications

The structure of the Kid toxin and CcdB toxins discussed above indicated that a common structural module could be shared by toxins reaching different targets. Indeed, the conservation of this module in another toxin of the Kid family, MazF (ChpAK), was demonstrated by Kamada *et al.* [86], who solved the crystal structure of the MazE–MazF TA complex (Fig. 3A).

This fascinating structure shows MazF and MazE in a hexamer that comprises two dimers of MazF and a dimer of the MazE antitoxin arranged linearly (MazF₂–MazE₂–MazF₂). This work provided the first structural image of an antitoxin from this family. The two MazE monomers form a structured region derived

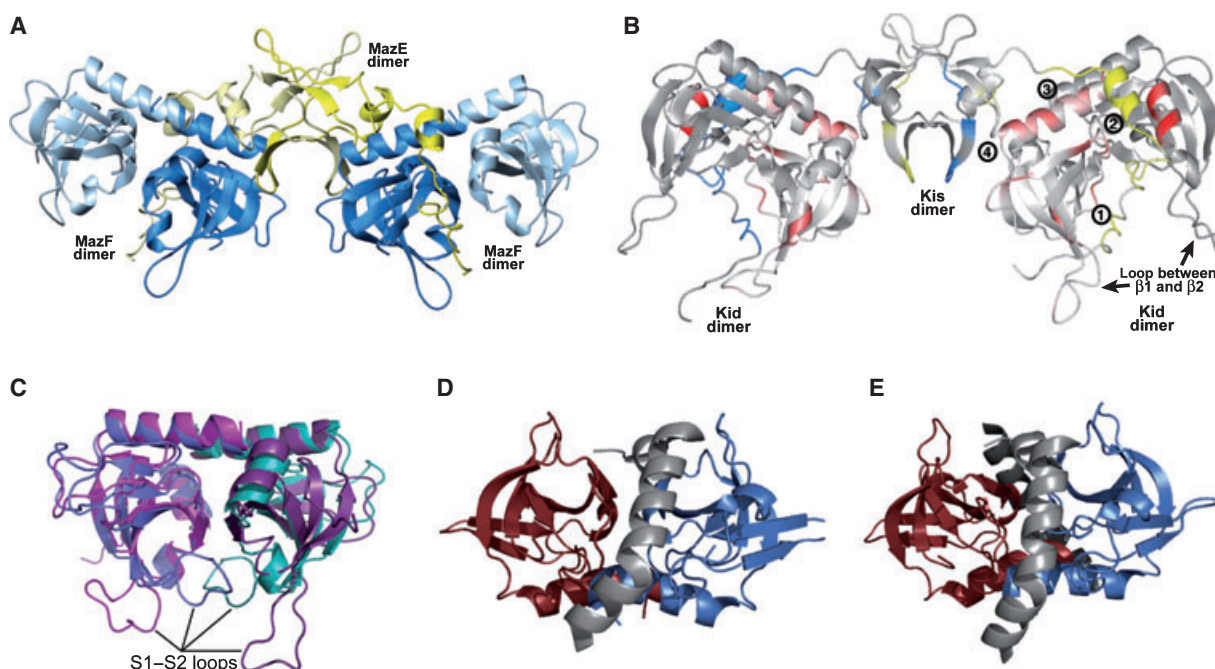


Fig. 3. Complexes of the toxin and antitoxin proteins of the *mazEF*, *parD* and *ccd* systems. (A) Ribbon representation of the crystal structure of the heterohexameric MazF₂-MazE₂-MazF₂ complex (PDB code: 1UB4). The toxin monomers are coloured dark/light blue and the antitoxin monomers are shown in dark/light yellow. (B) Kid-Kis interactions mapped on a ribbon representations of the hexameric Kid₂-Kis₂-Kid₂ model. The Kid-Kis hexamer is shown in two shades of grey. Kid residues affected by the addition of Kis are depicted in red, with light to dark red representing a mild to strong effect. Kid exists as a symmetric dimer and therefore two sets of originally identical residues can be distinguished. For clarity, however, only one of those sets is coloured red on each dimer. Kis residues affected by Kid binding are shown in yellow (first monomer) and blue (second monomer). The four interaction sites and the loop between β -strands 1 and 2, comprising residues S10 to G21, are indicated. (C) Overlay of Kid in the unbound state (PDB code: 1M1F) and MazF extracted from the hexameric MazF₂-MazE₂-MazF₂ complex (PDB code: 1UB4). The monomers of the Kid dimer are coloured pale blue and cyan and the monomers of the MazF dimer are shown in magenta and purple. The S1-S2 loop of unbound Kid exists in the closed state, whereas the S1-S2 loop of MazF exists in the open state as a result of the presence of MazE (not shown). (D) Ribbon representation of the crystal structure of the trimeric CcdB₂-C-terminal CcdA complex (PDB code: 3HPW) [89]. CcdB monomers are coloured ruby and marine blue and the C-terminal domain of CcdA is shown in grey. (E) Ribbon representation of the crystal structure of the tetrameric CcdB₂-C-terminal CcdA₂ complex (PDB code: 3G7Z) [89]. CcdB monomers are coloured ruby and marine blue and the C-terminal domain of both CcdA monomers is shown in light/dark grey. (A) Generated with the MOLMOL, version 2K.1 [136]. (B) Reproduced with permission [75]. (C-E) Generated with PYMOL, version 0.99rc6 [135].

from the two N-terminal regions and two flexible and divergent C-terminal regions. Each monomer of the antitoxin dimer contacts a dimer of the toxin in four different regions. In particular, a long C-terminal region of the antitoxin makes contacts with the terminal α -helices of the toxin and invades the interface of the two dimers of MazF. This is a conserved region in this toxin family, with a dominant electropositive character. The interaction changes the orientation of the N-terminal hairpins that connect toxin dimers, leaving this region undefined in the crystal structure. The structure of the hetero-hexameric TA complex Kid₂-Kis₂-Kid₂ has been modelled on the one of the MazE-MazF hetero-hexamer (Fig. 3B) [75]. Analysis of the Kid-Kis interactions by NMR spectroscopy supports four main interaction sites, as reported for the MazE-MazF complex. Sites 1 and 2 are responsible for the

proper neutralization of the Kid toxicity because they partly overlap with one of the RNA binding sites of Kid and could also be responsible for the distortion of the second RNA binding site by opening the N-terminal hairpin between β -strands 1 and 2 (Fig. 3C). Genetic analysis indicates that the orientation of the N-terminal hairpin, and the defined contacts at the interface of the two dimers, are essential for the toxic activity of Kid [66], thus indicating that distortions introduced within these critical regions by the Kis antitoxin can explain the neutralization of Kid toxicity. Site 3 and 4 interactions enhance the TA affinity and thus the inhibition of Kid. In addition, site 4 interactions, between Kid and the Kis N-terminal region, are probably involved in a proper TA orientation and in antitoxin monomer-monomer stabilization [75]. As previously reported, MazE/ChpAI can inefficiently

neutralize Kid toxicity. This less efficient neutralization of Kid toxicity was analyzed by MS and NMR spectroscopy [75]. Both methods showed that the affinity of Kid for MazE is much lower than for Kis. Furthermore, MS indicated that MazE and Kid form a neutralizing hetero-tetramer MazE₂-Kid₂ complex. NMR analyses showed that the sites of Kid-MazE interaction are largely the same as for Kid-Kis, except for the absence of site 4 interactions. On the basis of these results, the neutralization of Kid by MazE is also likely to take place via site 1 and 2 interactions. However, the conformation of the Kid N-terminal hairpin loop does not appear to be changed. Instead, the second RNA binding pocket is likely to be occupied by the second C-terminal tail of the MazE dimer, which is possible as a result of the lack of site 4 interactions. These data support the role of site 4 in promoting proper interactions of TA at sites 1 and 2 [75]. Further structural and functional information on the mechanism of action of Kid and MazF toxins supports this proposal (see below).

In the case of CcdA-CcdB interactions, it has been shown that the disordered C-terminal region of CcdA is responsible for the binding to CcdB and, upon binding to CcdB, this region becomes structured [82] and the protein is stabilized [87,88]. Recently, it was shown that the CcdB toxin has two sites with different affinities for CcdA [89]. These sites could play different roles either in the rejuvenation by CcdA of the CcdB poisoned-gyrase, CcdB₂-CcdA complex (Fig. 3D) or in the efficient repression of *ccd* promoter, CcdB₂-CcdA₂ complexes (Fig. 3E) (see below). Both functions would depend on the disordered C-terminal domain of CcdA [89].

Regulation and toxin activity in *parD* and closely-related TA systems

Regulation in the *parD* system

The regulation of the *parD* operon is modulated at the transcriptional and post-transcriptional levels. At the transcriptional level, regulation is performed by the concerted action of the Kis and Kid proteins: the antitoxin Kis has a weak regulatory activity on its own, which is greatly enhanced in the presence of Kid [90]. Transcription initiation in *parD* occurs from an extended (ten promoter) operator region containing two homologous palindromic sequences (I/II) spaced by 33 bp. Palindromes I and II (23 bp each) contain an internal inverted repeat (IR). IRI is a perfect inverted repeat of a 9 bp sequence (5'-GTTATATTT-3') that overlaps the extended -10 element and includes

the transcription initiation point (+1). IRII is an imperfect inverted repeat of 9 bp sequence (5'-GTTatTtt-3'; where lower case letters indicate bases without sequence symmetry) upstream of the -35 region (Fig. 4A).

Combined electrophoretic mobility shift assays (EMSA), MS and protein-DNA footprinting analyses, carried out in collaboration with Monti *et al.* [91], indicated that the antitoxin interacts specifically, and with low affinity, with the promoter-operator region, whereas the toxin alone does not. Antitoxin contacts at the promoter region occur both in palindromes I and II within the two arms of their inverted repetitions. EMSA analyses with DNA fragments containing region I or region II showed a preferential binding to region I. Native MS using, as DNA target, a fragment of 30 bp that includes region I indicated that antitoxin dimers are involved in the interaction and that two dimers interact with each arm of the enclosed inverted repeat (I and II). Furthermore, in agreement with its effect *in vivo*, the presence of the toxin increases *in vitro* the affinity and stability of the antitoxin complexes on the *parD* promoter-operator region [91].

Important clues helping to understand the requirement of the two proteins to form a regulatory complex were provided by an analysis of the complexes formed at different TA ratios in the presence or absence of its target DNA [75,91]. In the absence of DNA and with an excess of toxin, native MS analyses allowed the identification of several Kis-Kid complexes in addition to the highly abundant hetero-hexameric complex described above (Fig. 4B). In excess of the antitoxin, a hetero-octamer containing two dimers of the toxin and two dimers of the antitoxin could be detected in addition to the hetero-hexamer [75] (Fig. 4B). In the presence of the *parD* promoter-operator sequence and with an excess of the toxin, EMSA analysis detected unstable protein-DNA complexes of slow and intermediate mobility. However, when the antitoxin equals or exceeds the toxin, a predominant protein-DNA complex of intermediate mobility and increased stability was observed, suggesting that efficient regulation occurs at these toxin : antitoxin ratios. Footprinting analysis indicated that, with an excess of antitoxin, palindromic regions I and site II were protected from hydroxyl-radical cleavage by the protein complexes, and that protection occurred mainly in two regions corresponding to the arms of the inverted repetitions (I/II). Furthermore, the protection pattern observed with an excess of antitoxin is similar to that observed in complexes of the antitoxin alone, indicating that the antitoxin pilots the repressor interaction on the *parD* promoter-operator region [91].

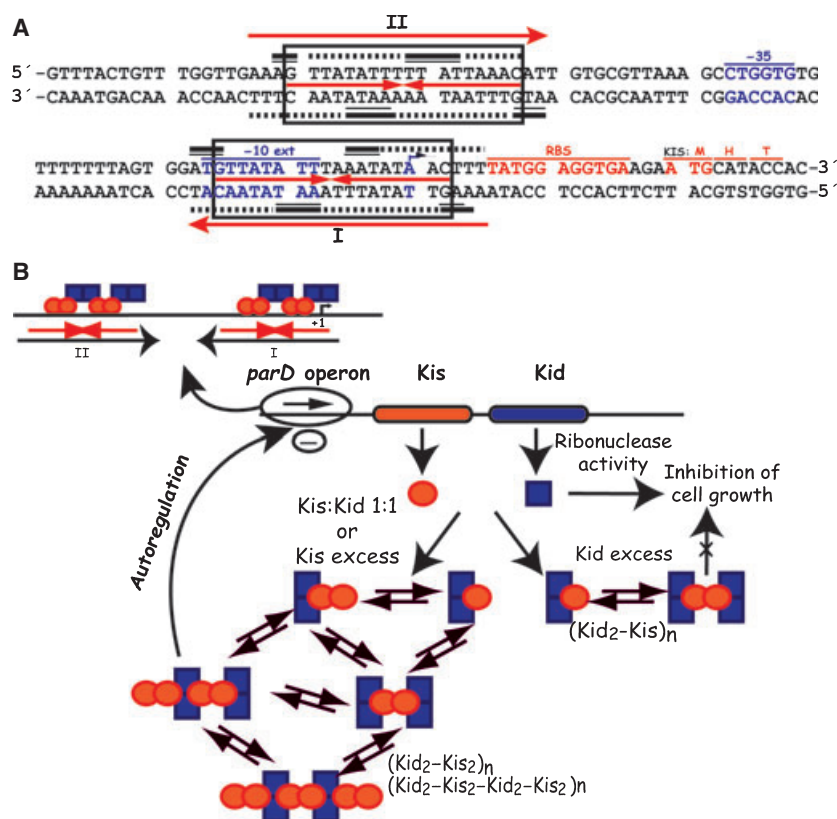


Fig. 4. Transcriptional regulation of *parD* system. (A) Summary of the regions in the *parD* promoter-operator protected by Kis and Kid-Kis complexes. The *parD* operator consists of two palindromic regions I/II (boxed) separated by 33 bp. Region I contains an 18 bp symmetric element (opposite red arrows), which includes the -10 extended motif. The region II, localized upstream of the 5'-end of the -35 element, contains an 18 bp pseudo-symmetric element (opposite red arrows). Bases whose deoxyriboses are protected from cleavage by hydroxyl radical by Kis (thick bars) or Kid-Kis (thin bars) binding are indicated (underlined). Conserved elements of the *parD* promoter, transcription initiation point (+1) and the extended -10 and -35 are indicated (blue letters). The ribosome-binding site (RBS) and translation initiation codon (Met) of *kis* are underlined and shown in red. The N-terminal amino acidic sequence of Kis is indicated (red capital letters). (B) Schematic model of the transcriptional autoregulation of the *parD* operon. *kid* gene and Kid protein are shown in blue and the *kis* gene and Kis protein are shown in orange. Each protein complex is represented by an appropriate combination of blue rectangles (Kid) and orange ellipses (Kis). Free Kid inhibits cell growth. In conditions where the ratio Kid : Kis is 2 : 1, Kid₂-Kis and Kid₂-Kis₂-Kid₂ complexes are formed. These complexes inhibit the ribonuclease activity of Kid but allow efficient transcription. When the concentration of Kid is equal or lower than that of Kis, Kis-Kid complexes with different stoichiometries are observed. All of these complexes are able to inhibit the ribonuclease activity of Kid. At this Kis : Kid ratio and in the presence of the *parD* promoter-operator DNA, a hetero-octamer complex is the only complex detected on the DNA. This complex appears to be the one binding more efficiently to the DNA promoter-operator region, suggesting that it might be the appropriated *parD* repressor complex.

Further information on the nature of the complexes was obtained by native MS using, as DNA target, the fragment of 30 bp mentioned above. With an excess of antitoxin, a hetero-octameric complex containing two dimers of the antitoxin and two dimers of the toxin is found on the DNA fragment, whereas, when the toxin exceeds the antitoxin, a hetero-hexameric complex is bound to the DNA [91]. This hetero-hexameric complex binds less efficiently to the promoter-operator region I than the hetero-octamer. Thus, with an excess of toxin, the equilibrium is displaced to the formation of an efficient hetero-hexameric neutralization complex, where a

dimer of the antitoxin can neutralize two dimers of the toxin. This complex binds poorly to the DNA and therefore cannot repress efficiently the *parD* promoter. Interestingly, the equilibrium can be displaced to favour the formation of the hetero-octameric regulatory complex if further antitoxin is added. Consequently, the requirement of two proteins to form the regulatory complex allows a reversible equilibrium between the regulated and unregulated situation in response to fluctuations in the relative levels of both proteins (Fig. 4B) [91].

Tandem MS provided the first information on the structure and organization of the hetero-octamer: the

analysis of the collision products of the TA heterooctamer with an inert gas (argon), either free or in complex with the DNA, is consistent with the proposal that Kis dimers are stabilized by interactions with DNA in the complex [91]. Notably, dimers of the Kis homologous MazE antitoxin have been found to bind to the alternating palindrome sequence found in the *mazEF* promoter–operator region and a model of the interactions has been proposed [92]. These data provide structural support to the alternating palindrome regulation model proposed previously [93].

Additional post-transcriptional regulatory circuits can modulate the levels of these proteins: these include the coupling of the toxin to the antitoxin synthesis and the limited degradation of the polycistronic *parD* messenger, which gives rise to mRNAs containing only the antitoxin message [94]. Indirect data indicate that the Lon protease is required to activate the system in plasmid-free segregants [38], implying that it preferentially degrades the antitoxin. The balance of these transcriptional and post-transcriptional regulatory circuits, determine the relative levels of the Kis and Kid proteins and therefore the expression level of the system (see below). Under normal situations, the antitoxin exceeds the toxin (ratio close to 2 : 1) and the system remains repressed. It can be foreseen that a situation increasing the basal activity of the Lon protease (such as amino acid and carbon source limitation) can lead to an excess of the toxin and, eventually, to the inhibition of cell growth/viability by this protein.

This type of transcriptional regulatory mechanism is found, with variations, in most TA stability systems [95,96]. A well reported case is the *ccd* system. Different TA complexes have been found, depending on the precise toxin : antitoxin ratios [97]. As shown by EMSA assays, CcdA₂–CcdB₂ complexes bind to the *ccd* operator–promoter region. When further CcdB toxin is added, the protein–DNA complexes are destabilized and the formed hexamer CcdB₂–CcdA₄ fails to bind to DNA, suggesting that promoter repression occurs when CcdA antitoxin exceeds CcdB toxin. This is consistent with the increased stability of the protein–DNA complexes formed at a CcdA : CcdB ratio of one, where a stable (CcdA₂–CcdB₂)_n complex with multiple DNA binding sites is assembled as an spiral around the promoter region [98]. The formation of these complexes has been shown to depend on the different affinities of the disordered C-terminal domain of CcdA for two sites in CcdB [89]. As a model for this complex, the binding of up to three CcdA antitoxin dimers to DNA fragments corresponding to the operator–promotor region was analyzed by NMR spectroscopy [82]. One CcdA dimer specifically recognizes a 6 bp palindromic sequence at site I in the

promoter–operator region. Protein–DNA interactions in this complex involve three residues of the N-terminal β -sheet (R4, T6 and T8) [82]. The N-terminal region of the CcdA protein was found to be required for regulation of the system. A mutated protein containing only 41 C-terminal residues was able to neutralize the toxin but was not able to autoregulate or to bind to DNA promoter region [97]. Two adjacent lower-affinity binding sites on the DNA (II and III) have been found for the CcdA dimers that allow direct interactions between the dimers and thus could explain the observed cooperativity in DNA binding to the promoter region [82].

Defining the activity of the Kid toxin

The replication clue

We have been aiming to understand the mode of action of the Kid toxin ever since 1991, when it was first demonstrated that it could prevent the lytic induction of bacteriophage λ [64]. These observations suggested that Kid could target at least particular DNA replication systems. Subsequently, a protocol to purify Kid and Kis proteins was devised and it was found that Kid specifically inhibits the replication of plasmid ColE1 *in vitro* [63]. Further work confirmed that the inhibition of ColE1 replication *in vivo* by Kid was specific and demonstrated that this toxin inhibits the *de novo* initiation of λ DNA replication in cells [99]. Additional data revealed a functional link between Kid and the main replicative DNA helicase of *E. coli*, DnaB because the cells were protected from Kid toxicity by moderate over-expression of the DnaB protein [63]. Because Kid failed to inhibit replication of P4 DNA, which is independent of DnaB, and inhibited the replication of ColE1 and λ , which are DnaB-dependent, it was initially considered that Kid was targeting DnaB [63,100]. Further experiments, however, did not fit with this hypothesis: purified Kid toxin failed to inhibit significantly the helicase activity of DnaB or the DnaB-dependent conversion of single-stranded phage Φ 174 DNA to the double-stranded form [100]. Kid also did not inhibit significantly ongoing rounds of *oriC* replication *in vivo* (K. Skarstad personal communication). This strongly suggested that the toxicity of Kid was not the result of a direct effect on chromosome replication and that the effects on ColE1 and λ DNA replication might be a consequence of the more general activity of the toxin.

The RelE clue

Understanding the effect of the toxin on ColE1 and λ replication and the protection of Kid toxicity by DnaB

remained a riddle, whose solution required the identification of the direct target of the Kid toxin. Additional clues regarding the biological activity of Kid came from work on RelE and ChpAK toxins. These two toxins inhibit protein synthesis [101]. The mechanism of action of RelE was deciphered in a study by Pedersen *et al.* [102], in which it was demonstrated that RelE promotes the catalytic cleavage of mRNA in the A site of the ribosome, thus preventing the release of the newly-synthesized peptide and the recycling of the ribosome. This leads to the inhibition of protein synthesis. The fact that this mRNA cleavage requires synthesis of proteins and the complexity of the RelE target itself (mRNA on the ribosome) nevertheless prevented the clear identification of the direct target of this toxin. Was the toxin cutting directly mRNA on codons exposed in the A site, or was it promoted by the ribosome? (as indeed, pauses during translation can result in the cleavage of mRNA) [103].

These questions have been clarified in light of the resolution of the crystal structure of RelE in isolation and bound to programmed *Thermus thermophilus* 70S ribosomes before and after mRNA cleavage. RelE is positioned at the ribosomal A site and, via 2'-OH-induced hydrolysis, causes the cleavage of mRNA after the second nucleotide of the codon. In this process, reorientation of the mRNA is required for the cleavage. The requirement for the ribosome in the catalytic activity of RelE is explained by the stacking of A site codon bases with conserved residues in both RelE and 16S rRNA [104]. It has been proposed that the concerted action of a RelE-like protein and an exonuclease such as RNase II could explain the previously proposed ribosomal RNase activity in response to ribosome stalling during translation [105].

Ribosomal-independent cleavage of RNA

Zhang *et al.* [106] first reported an important finding that has clarified the activity of the MazF and Kid (PemK) toxins. They showed that, as opposed to RelE, MazF (ChpAK) and PemK toxin (identical to Kid) target and cleave RNA in the absence of ribosomes. RNA cleavage in solution performed by these toxins occurred with different specificity and both inhibit protein synthesis in prokaryotic and eukaryotic cells extracts [106]. The antitoxins MazE and Kis neutralized the activities of MazF and Kid, respectively.

We have independently corroborated the ribosome-independent cleavage of RNA by these toxins and their potential to inhibit protein synthesis in prokaryotic and eukaryotic cell extracts [107]. Kid (PemK) acts as endoribonuclease that recognizes and cleaves *in vivo*

and *in vitro* within sequences containing the core sequence 5'-UA(A/C/U)-3', either at 5' or 3' of A [107,108]. Flanking uracils at 5' or 3' make a preferred target both *in vivo* and *in vitro*, although cleavage at core sequences not flanked by uracils has also been observed [35,107–110]. Indeed, specific cleavage at 5'-UUACU-3' has been shown to be related to the specific role of this system in plasmid R1 stabilization. This sequence is present in the intergenic region of the polycistronic *copB-repA* mRNA and its cleavage by the Kid toxin decreases the stability of the messenger for the CopB protein, which is a repressor of the internal *repA* promoter; the subsequent decrease of CopB levels increases the levels of the RepA initiation protein and raises the frequency of replication initiation [35]. This contributes to an increase in the stability of the plasmid with a compromised replication, as previously reported [34].

The mechanism of RNA cleavage by Kid toxin has been clarified to a substantial degree by convergent structural and functional studies. In 2006, a model for RNA binding and the catalytic site of the Kid toxin was described [109]. It was found that Kid cleaved between U and A of a short RNA substrate, 5'-AUACA-3' containing the UAC core sequence, and that it also can cleave the minimal substrate UpA. Cleavage required the uracil 2'-OH group and yielded two fragments, one with a 2'-3'-cyclic phosphate group and the other with a free 5'-OH group (Fig. 5A). This indicated that the RNA cleavage mechanism by Kid is similar to that of RNase A and RNase T1 and involves a catalytic acid, a catalytic base and a residue stabilizing the reaction intermediate. RNA binding occurs on a concatemeric RNA surface containing residues of both Kid monomers that form two symmetric binding surfaces on the Kid dimer. These data were defined via NMR titration studies with an uncleavable RNA mimetic, 5'-AdUACA-3', carrying a uracil 2'-H group. Similar interactions, although less tight, were obtained using a 5'-d(AUACA)-3' substrate, possibly as a result of the involvement of the 2'-OH groups in the interactions. Data indicated that a dimer is the active form of the enzyme, which is consistent with inactivation of the toxin by mutating residues that interconnect the two subunits, such as E18 and R85 [66]. The detailed position of the 5'-AUACA-3' fragment within the binding pocket was defined by docking calculations based on changes of the NMR chemical shifts upon addition of the RNA mimetic, the cleavage mechanism and previously reported mutagenesis data. The model proposed that residues Asp75, Arg73 and His17 form the active site of the toxin (Fig. 5B). Residues Asp75 and Arg73 de-protonate the

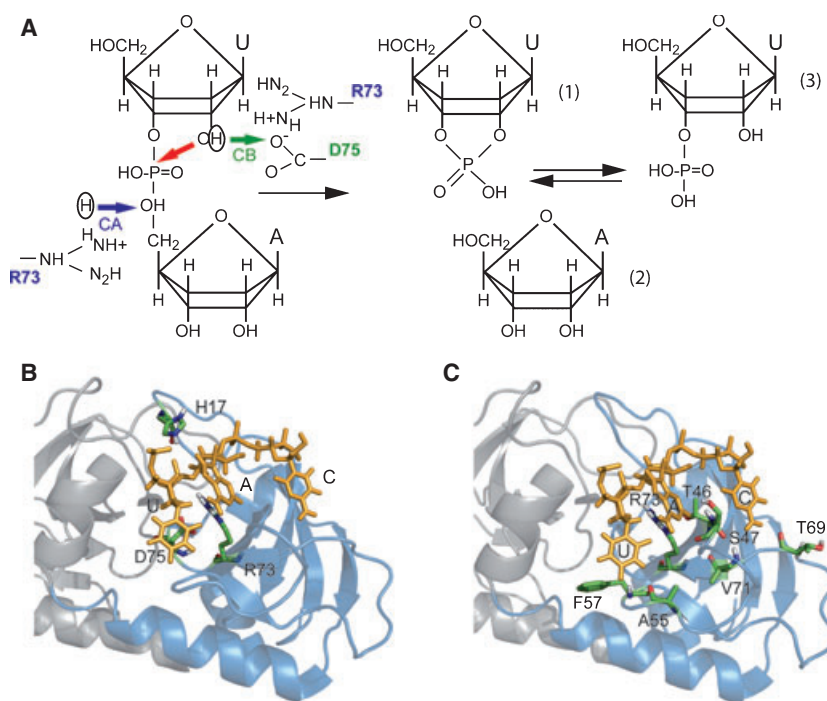


Fig. 5. Cleavage mechanism of RNA by Kid toxin and key residues involved in RNA binding and cleavage. (A) Cleavage reaction mechanism of the UpA dinucleotide by Kid RNase toxin. The 2'-OH group of the ribonucleotide is deprotonated (green arrow) by a catalytic base (D75, green) with the help of an R73 residue. This activated oxygen subsequently attacks the electrophilic phosphorus (red arrow). The catalytic acid (R73, blue) transfers a hydrogen atom to the leaving group (blue arrow). The 2':3'-cyclic phosphate intermediate (1), the 5'-OH group (2) and the final 3'-monophosphate nucleotide (3), resulting from the hydrolysis of the cyclic intermediate, are shown. (B, C) Showing a ribbon representation of the NMR model structure of Kid dimer bound to 5'-AdUACA-3' mimetic RNA. Kid monomers are shown in light grey and blue and RNA UAC bases are shown as orange sticks. (B) Residues of the catalytic site (R73, D75 and the stabilizing residue H17) are highlighted as coloured sticks. (C) Residues involved in specific RNA binding (T46, S47, A55, F57, T69, V71 and R73) are highlighted as coloured sticks.

2'-OH group of the uracil and activate the oxygen, which subsequently performs a nucleophilic attack on the electrophilic phosphorus (Fig. 5A). The catalytic acid Arg73 completes the transphosphorylation reaction after donation of a hydrogen atom to the adenosine 5'-OH. Residue His17 establishes stabilizing interactions with the attacked phosphate (Fig. 5B). The model also proposes that the RNA sequence specificity is defined by interactions of residues Thr46, Ser47, Ala55, Phe57, Thr69, Val71 and Arg73 with the bases of the core UAC sequence (Fig. 5C). The minimal reaction product 2':3'-cUMP could also bind to the same region of Kid. Binding of this ligand clearly inhibited the RNase activity of Kid [25]. Native MS using the uncleavable RNA mimetic indicates that a dimer of the Kid toxin interacts with a single RNA substrate. This implies that RNA binding to one of the symmetric binding surfaces introduces structural changes in the Kid protein that prevent the binding of a second substrate to the second symmetric binding site [109].

An analysis of RNA binding and cleavage activity conducted with a collection of Kid mutants in key residues evaluated by MS was essentially consistent with the above assignments [110]. Indeed, mutations affecting each of the three residues of the proposed active site were found to interfere with the RNA cleavage without substantially affecting RNA binding, whereas mutants affecting residues proposed to be involved in specific RNA binding had a reduced binding activity but maintained a basic, although reduced, RNase activity. *In vivo* analysis confirmed the correlation between the RNase activity of the protein, its potential to inhibit protein synthesis and its toxicity. RNA cleavage assays performed with the 5'-UUACU-3' and 5'-AUACA-3' substrates confirmed that a substrate with flanking uracils is cleaved far more efficiently.

This evaluated model provides a reference for comparison with the homologous toxins CcdB, MazF and ChpBK. The absence in CcdB of multiple residues involved in Kid RNA binding or cleavage explains the lack of RNase activity in this toxin, even though its

structure is closely related to Kid (Fig. 2). At the position of the catalytic base, an acidic residue (Asp or Glu) is conserved among Kid homologous toxins with the exception of ChpBK toxin, where a glutamine can be found in the equivalent position [65]. This change could explain the reduced endoribonuclease activity of ChpBK [39,109,111].

RelE and Kid: the RF1 connections

It was previously shown that the translation releasing factor RF1 competes *in vitro* for the RelE-mediated mRNA cleavage at the A site of the ribosome [102]. This competition could be a result of the very stable binding of RF1 to this ribosomal site [112] where RelE acts [102,104]. The protection exerted by RF1 was evaluated *in vivo* with new mutants in *prfA* (i.e. the RF1 gene). These mutations resulted in a ten-fold decrease in RF1 translation termination activity without substantially affecting the stability of this translation termination factor as determined by Diago-Navarro *et al.* [113]. Structural information suggests that mutations could affect directly or indirectly the codon recognition at the A site of the ribosome, and thus translation termination. Consistent with the protection by RF1 of mRNA cleavage mediated by RelE *in vitro* [102], RF1 mutants showed increased sensitivity to the RelE toxin *in vivo*, as revealed in cell growth and protein synthesis assays [113]. Surprisingly, these mutants also showed an increased sensitivity to Kid toxin. Expression in *trans* of wild-type RF1 protein or of Kis and RelB antitoxins restored cell growth and protein synthesis inhibited by the action of Kid or RelE toxins. The increased sensitivity to Kid toxin was not anticipated because, in contrast to RelE, the Kid toxin can cleave RNA in a ribosome-independent manner (see above). This result provided evidence for the 'negative' involvement of RF1 in the pathway of Kid toxicity. Kid mutations abolishing the RNase activity of Kid also abolished the increased sensitivity to this toxin in RF1 mutants, indicating that RNA cleavage mediated by Kid was involved in this phenotype [114]. The data suggest that, in the absence of RF1 mutations, this translation termination factor could prevent the direct inhibition of the translation machinery by the Kid toxin. Further experiments are required to clarify this intriguing result.

Implication of the RNase activity of Kid

RNA cleavage activity of the toxins might have lateral effects on RNA-dependent processes other than protein synthesis. Indeed, this was clearly shown by the ability of this toxin to inhibit ColE1 replication *in vitro* [63]

and by its interference with lytic induction of the λ bacteriophage [64] or during propagation of the λ and ColE1 replicons *in vivo* [99]. Interference of Kid with ColE1 replication could be explained by the requirement of transcription to synthesize the primer that initiated ColE1 replication [115]. Inhibition of λ replication is probably a result of the inhibition of synthesis and the rapid decay of the unstable λ O protein whose *de novo* synthesis is required to initiate new rounds of phage replication [116]. This was supported by the fact that Kid inhibited initiation of λ replication in the copy of this replicon that initiates DNA synthesis *de novo* but not in the copy that inherited the λ replication complex [99]. How DnaB can protect from Kid toxicity remains to be clarified, although an interesting hypothesis might be that protection is the result of the stimulation by DnaB of the synthesis of short RNAs by DnaG primase [117]; some of these RNA primers could titrate the RNase activity of Kid or could bind to the active site of the enzyme, thus interfering with the binding of proper RNA substrates. This hypothesis has gained support by the protection observed with a DnaB fragment that conserved the DnaG interaction region [100]. Interestingly 2':3'-cUMP, one of the Kid cleavage products of the minimal RNA substrate UpA, was shown to be able to inhibit the RNase activity of this toxin [25] (see above).

As noted above, activation of Kid induced by inefficient replication of plasmid R1 led to a recovery of plasmid replication efficiency. This rescuing was eventually explained by the increased levels of RepA originating from efficient cleavage by Kid at the unique 5'-UACAU-3' sequence present in the polycistronic *copB-repA* mRNA [35]. This cleavage activated the internal *repA* promoter repressed by CopB, presumably as a result of 3'-5' degradation of the *copB* mRNA. Increased levels of RepA lead to an increase in the frequency of plasmid replication [35].

Bacterial TA systems as potential biotech tools

The precise characterization of the RNase activity of Kid sets a rational basis for understanding the effects of the Kid toxin in eukaryotes as well as for further biotechnological developments both in prokaryotes and eukaryotes.

Activities of Kis and Kid in eukaryotic cells

Even before RNA was identified as the direct target of Kid, the bacterial Kid toxin was known to prevent proliferation of eukaryotic cells [118]. This discovery

was initially made in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* using a construction in which the genes of Kid toxin and Kis antitoxin were in independent transcription units. In the presence of effectors that favoured the expression of the toxin, yeast colony formation dropped by four orders of magnitude and the predominant expression of the Kis antitoxin neutralized the Kid toxic effect. This indicated that both the toxin and the antitoxin were active in yeast.

The confirmation of this finding showed that Kid and Kis were also active in metazoan cells [118]. Microinjection of Kid toxin (or the Kis–Kid complex as a control) into oocytes of *Xenopus laevis* and human tumour cells (HeLa) specifically inhibited cell proliferation and viability. In both systems, the toxin was able to kill, whereas the antitoxin neutralized its action.

To further analyse the effect of the toxin and the antitoxin in HeLa cells, the proteins were expressed *in vivo* with the toxin gene under the control of a constitutive promoter (i.e. so it was expressed continuously) and the antitoxin genes under the control of a repressible promoter. When both genes were expressed, the cells grew normally but, when antitoxin gene expression was repressed, growth was inhibited and the cells subsequently died by apoptosis as a result of Kid activity [118].

Similar observations have been reported for the RelE toxin [119,120], and this mode of action is most probably also valid for the ChpAK toxin, which, in addition to cleaving RNA *in vitro*, is an inhibitor of protein synthesis in cell extracts of prokaryotes and eukaryotes [106].

Some possible biotechnological applications of *parD*

The observations with eukaryotic cells indicate that regulated expression of Kid and Kis might be employed to kill cancer cells in a selective way. This may be achieved by expressing the *kid* and *kis* genes under the control of promoters that are, respectively, induced and repressed in tumour cells, and that have the inverse behaviour in normal cells. This would favour the production of the toxin in tumour cells. Because Kid also inhibits the growth of embryonic cells, a similar strategy might be used to prevent the growth of particular cell lineages during development. This approach could have value in studies of differentiation, organogenesis or degenerative disorders [118]. Indeed, the *parD* system has been used to study the role of the germ line in the sex differentiation in zebrafish during the somatic development. Kid toxin expression was employed to eliminate selectively pri-

mordial germ cells, whereas the uniform expression of Kis antitoxin protected somatic cells lines [121].

Recently, the *parD* system has been used to achieve a high and stabilized transgene expression in extensively proliferating cultures. Cells conditionally expressing *kid* were used to create overexpressing cells by coupling *kis* to the transgene of interest [122].

TA cassettes can be used as ‘containment’ systems in genetic modified yeast, fungi or bacterial cells considered highly risky and such a system has been developed using the *relBE* system in *Sacharomyces cerevisiae* [119]. In this containment system, the RelE toxin is kept under control under laboratory conditions as a result of the combined effects of a glucose repressible promoter and a basal expression of the RelB antitoxin. In cells released into the environment, derepression of the promoter, as a result of low levels of glucose, should lead to RelE-mediated cell growth arrest.

The toxic action of Kid in prokaryotic cells has already been used to develop direct-selection cloning vectors carrying the *kid* gene [123]. The vectors include the *kid* gene and convenient cloning sites that are designed to disrupt expression of the toxin when a DNA vehicle is inserted. Cells transformed with these recombinants grow but cells transformed with the vector alone do not. *ccdB* was the first toxin gene to be used in the development of positive-selection vectors [124]; several generations of positive-selection vectors based on this TA system have been further developed, such as the Gateway system [125–127]. Technology based on the *ccd* TA system has been used for plasmid stabilization in protein production processes [128,129].

MazF RNase activity has been used to develop a single protein production system in bacteria. This was achieved by engineering an mRNA that does not contain the MazF target sequence 5′-ACA-3′. By overexpressing MazF a scenario was created under which the production of the protein encoded by the engineered mRNA (in this case the human eotaxin) was highly enriched [130].

The different specificities of the Kid and MazF (ChpAK) toxins on their RNA targets indicate that a synergistic effect could be obtained through the combination of these toxins to enhance their antiproliferative effects both in prokaryotic and eukaryotic cells.

The structural and functional information available on TA interactions in several systems makes it possible to search for or design molecules that are able to interfere with these interactions and trigger the activity of the toxin. Bioluminescence resonance energy transfer technology has been used to monitor TA interactions [131,132]. These assays could comprise a powerful tool in the search for possible inhibitors of the interaction.

These 'toxin triggers' could be used to prevent growth or to kill prokaryotic or eukaryotic cells that contain endogenous or acquired TA systems.

The activation of the *mazEF* system by antibiotics that inhibit transcription or translation [132] also has implications for increasing bacterial sensitivity to these antibiotics. The structural information on CcdB toxin has recently been employed in the design of novel peptides with type II topoisomerase inhibitory activity [133].

Concluding remarks

parD of R1, jointly with *ccd* of F and *parB/hok-sok* of R1, contributed to establishing the field of TA systems at an early stage. Subsequent to its serendipitous discovery in our laboratory, the *parD* system of plasmid R1 has shed light on the basic and biotechnological potentials of TA systems, particularly those in which the toxin targets and inactivates RNA. This review summarizes, from an integrated functional/structural perspective, the discovery of *parD*; its function, complex regulation, toxin activity and its effects on RNA-dependent processes; and, last but not least, its biotechnological potential. We also highlight the structural and functional relationships between *parD* and closely-related TA systems with a special reference to *ccd* of plasmid F, whose toxin, CcdB, shares a substantial structural similarity to Kid, the toxin of *parD*.

Many TA systems have been discovered in plasmids and chromosomes, and increasing numbers of them have been (or are being) characterized at both functional and structural levels. The available information indicates that plasmidic TA systems contribute to the maintenance of the extrachromosomal genetic information in bacterial populations by interfering selectively with the growth or viability of plasmid-free segregants. TA systems are also found in the chromosomes of bacteria and archaea where they can play different functions, notably regulation of cell growth and viability under different stress conditions. The contribution of TA systems to microbial adaptation under these conditions is a subject of intense research and controversy. Particular TA systems contribute to bacterial persistence, virulence or even to differentiation within the bacterial populations. The occurrence of multiple TA systems in the same host allows the evaluation of their phylogeny, their synergies or the possible functional differences between them. Global Omics analyses should greatly contribute to our understanding of the interactions and regulatory networks involved. The biotechnological potential of TA systems in prokaryotes and eukaryotes has been partially explored. The

growing characterization of many TA systems promises new developments of basic and biotechnological relevance in the near future.

Acknowledgements

This research has been supported in the past by several grants from the Ministerio de Educación y Cultura (Spain) and the European Commission (EC grants BIO4980106, QLK2-2000-00634) and, more recently, by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (CSD2008-00013, BFU 2008-01566/BMC, BFU 2008-0079-E/BMC), the Programa de Grupos Estratégicos de la Comunidad Autónoma de Madrid (COMBACT-CM, S-BIO-0260-2006) and access to EC Research Infrastructures activity (contract RII3-026145, EU-NMR). E.D.-N. acknowledges support from the Basque Country Government (BFI2005.35) and short-term EMBO fellowship (ASF 2006), J.L.V. acknowledges support from FEMS short-term fellowship, and M.B.K. was supported by the Center for Biomedical Genetics. We would like to acknowledge the technical assistance of Alicia Rodríguez-Bernabé and the critical reading of the manuscript by Rafael Giraldo. The many discussions and contributions of different collaborators and colleagues during this research are gratefully acknowledged.

References

- 1 Nordstrom K (2006) Plasmid R1 – replication and its control. *Plasmid* **55**, 1–26.
- 2 del Solar G, Alonso JC, Espinosa M & Diaz-Orejas R (1996) Broad-host-range plasmid replication: an open question. *Mol Microbiol* **21**, 661–666.
- 3 Gerdes K, Ayora S, Canosa I, Ceglowski P, Diaz-Orejas R, Franch T, Gulyaev AP, Bugge Jensen R, Kobayashi I, Macpherson C, Summers D, Thomas CM & Zielenkiewicz U (2000) *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread* (Thomas C, ed), pp. 49–85. Harwood Academic Publishers, The Netherlands.
- 4 Nordstrom K, Molin S & Aagaard-Hansen H (1980) Partitioning of plasmid R1 in *Escherichia coli*. I. Kinetics of loss of plasmid derivatives deleted of the *par* region. *Plasmid* **4**, 215–227.
- 5 Gerdes K, Rasmussen PB & Molin S (1986) Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 3116–3120.
- 6 Engelberg-Kulka H & Glaser G (1999) Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol* **53**, 43–70.

- 7 Holcik M & Iyer VN (1997) Conditionally lethal genes associated with bacterial plasmids. *Microbiology* **143** (Pt 11), 3403–3416.
- 8 Hayes F (2003) Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* **301**, 1496–1499.
- 9 Yarmolinsky MB (1995) Programmed cell death in bacterial populations. *Science* **267**, 836–837.
- 10 Cooper TF & Heinemann JA (2000) Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12643–12648.
- 11 Poole AM (2009) Horizontal gene transfer and the earliest stages of the evolution of life. *Res Microbiol* **160**, 473–480.
- 12 Nordström K, Ingram LC & Lundback A (1972) Mutations in R factors of *Escherichia coli* causing an increased number of R-factor copies per chromosome. *J Bacteriol* **110**, 562–569.
- 13 Nordstrom K, Molin S & Light J (1984) Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular biology, and physiology of the plasmid R1 system. *Plasmid* **12**, 71–90.
- 14 Gerdes K, Larsen JE & Molin S (1985) Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *J Bacteriol* **161**, 292–298.
- 15 Moller-Jensen J, Jensen RB, Lowe J & Gerdes K (2002) Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *EMBO J* **21**, 3119–3127.
- 16 Gerdes K, Gulyaev AP, Franch T, Pedersen K & Mikkelsen ND (1997) Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu Rev Genet* **31**, 1–31.
- 17 Gerdes K & Wagner EG (2007) RNA antitoxins. *Curr Opin Microbiol* **10**, 117–124.
- 18 Bravo A, de Torrontegui G & Diaz R (1987) Identification of components of a new stability system of plasmid R1, *parD*, that is close to the origin of replication of this plasmid. *Mol Gen Genet* **210**, 101–110.
- 19 Ogura T & Hiraga S (1983) Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 4784–4788.
- 20 Tsuchimoto S, Ohtsubo H & Ohtsubo E (1988) Two genes, *pemK* and *pemI*, responsible for stable maintenance of resistance plasmid R100. *J Bacteriol* **170**, 1461–1466.
- 21 Gerdes K, Christensen SK & Lobner-Olesen A (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev* **3**, 371–382.
- 22 Buts L, Lah J, Dao-Thi MH, Wyns L & Loris R (2005) Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem Sci* **30**, 672–679.
- 23 Condon C (2006) Shutdown decay of mRNA. *Mol Microbiol* **61**, 573–583.
- 24 Engelberg-Kulka H, Amitai S, Kolodkin-Gal I & Hazan R (2006) Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet* **2**, e135.
- 25 Kamphuis MB, Monti MC, van den Heuvel RH, Lopez-Villarejo J, Diaz-Orejas R & Boelens R (2007) Structure and function of bacterial *kid-kis* and related toxin-antitoxin systems. *Protein Pept Lett* **14**, 113–124.
- 26 Van Melderen L & Saavedra De Bast M (2009) Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet* **5**, e1000437.
- 27 Pandey D & Gerdes K (2005) Toxin- antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **55**, 78–89.
- 28 Makarova KS, Wolf YI & Koonin EV (2009) Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol Direct* **4**, 19.
- 29 Bravo A, Ortega S, de Torrontegui G & Diaz R (1988) Killing of *Escherichia coli* cells modulated by components of the stability system *parD* of plasmid R1. *Mol Gen Genet* **215**, 146–151.
- 30 Tsuchimoto S & Ohtsubo E (1989) Effect of the *pem* system on stable maintenance of plasmid R100 in various *Escherichia coli* hosts. *Mol Gen Genet* **215**, 463–468.
- 31 Jensen RB, Grohmann E, Schwab H, Diaz-Orejas R & Gerdes K (1995) Comparison of *ccd* of F, *parDE* of RP4, and *parD* of R1 using a novel conditional replication control system of plasmid R1. *Mol Microbiol* **17**, 211–220.
- 32 Bernard P & Couturier M (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**, 735–745.
- 33 Ortega S, de Torrontegui G & Diaz R (1989) Isolation and characterization of a conditional replication mutant of the antibiotic resistance factor R1 affected in the gene of the replication protein *repA*. *Mol Gen Genet* **217**, 111–117.
- 34 Ruiz-Echevarria MJ, de-la-Torre MA & Diaz-Orejas R (1995) A mutation that decreases the efficiency of plasmid R1 replication leads to the activation of *parD*, a killer stability system of the plasmid. *FEMS Microbiol Lett* **130**, 129–135.
- 35 Pimentel B, Madine MA & de la Cueva-Mendez G (2005) Kid cleaves specific mRNAs at UUACU sites to rescue the copy number of plasmid R1. *EMBO J* **24**, 3459–3469.
- 36 Ryder TB, Davidson DB, Rosen JI, Ohtsubo E & Ohtsubo H (1982) Analysis of plasmid genome evolution based on nucleotide-sequence comparison of two related plasmids of *Escherichia coli*. *Gene* **17**, 299–310.
- 37 Tsuchimoto S & Ohtsubo E (1993) Autoregulation by cooperative binding of the *PemI* and *PemK* proteins to the promoter region of the *pem* operon. *Mol Gen Genet* **237**, 81–88.

- 38 Tsuchimoto S, Nishimura Y & Ohtsubo E (1992) The stable maintenance system *pem* of plasmid R100: degradation of PemI protein may allow PemK protein to inhibit cell growth. *J Bacteriol* **174**, 4205–4211.
- 39 Masuda Y, Miyakawa K, Nishimura Y & Ohtsubo E (1993) *chpA* and *chpB*, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the *pem* locus responsible for stable maintenance of plasmid R100. *J Bacteriol* **175**, 6850–6856.
- 40 Santos-Sierra S, Giraldo R & Diaz-Orejas R (1997) Functional interactions between homologous conditional killer systems of plasmid and chromosomal origin. *FEMS Microbiol Lett* **152**, 51–56.
- 41 Santos-Sierra S, Giraldo R & Diaz-Orejas R (1998) Functional interactions between *chpB* and *parD*, two homologous conditional killer systems found in the *Escherichia coli* chromosome and in plasmid R1. *FEMS Microbiol Lett* **168**, 51–58.
- 42 Mittenhuber G (1999) Occurrence of *mazEF*-like anti-toxin/toxin systems in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 295–302.
- 43 Metzger S, Dror IB, Aizenman E, Schreiber G, Toone M, Friesen JD, Cashel M & Glaser G (1988) The nucleotide sequence and characterization of the *relA* gene of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**, 15699–15704.
- 44 Aizenman E, Engelberg_Kulka H & Glaser G (1996) An *Escherichia coli* chromosomal ‘addiction module’ regulated by guanosine [corrected] 3′,5′-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6059–6063.
- 45 Gross M, Marianovsky I & Glaser G (2006) MazG – a regulator of programmed cell death in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **59**, 590–601.
- 46 Kolodkin-Gal I, Hazan R, Gaathon A, Carmeli S & Engelberg-Kulka H (2007) A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for *mazEF*-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* **318**, 652–655.
- 47 Kolodkin-Gal I & Engelberg-Kulka H (2008) The extracellular death factor: physiological and genetic factors influencing its production and response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**, 3169–3175.
- 48 Nariya H & Inouye M (2008) MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* **132**, 55–66.
- 49 Gerdes K (2000) Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J Bacteriol* **182**, 561–572.
- 50 Christensen SK, Pedersen K, Hansen FG & Gerdes K (2003) Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J Mol Biol* **332**, 809–819.
- 51 Morganroth PA & Hanawalt PC (2006) Role of DNA replication and repair in thymineless death in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 5286–5288.
- 52 Tsilibaris V, Maenhaut-Michel G, Mine N & Van Melderen L (2007) What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *J Bacteriol* **189**, 6101–6108.
- 53 Christensen SK & Gerdes K (2003) RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Mol Microbiol* **48**, 1389–1400.
- 54 Anantharaman V & Aravind L (2003) New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. *Genome Biol* **4**, R81.
- 55 Clissold PM & Ponting CP (2000) PIN domains in nonsense-mediated mRNA decay and RNAi. *Curr Biol* **10**, R888–R890.
- 56 Munoz Gomez A (2004) Identificación y caracterización de la actividad RNasa de las toxinas bacterianas Kid y ChpAK. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- 57 Moyed HS & Bertrand KP (1983) *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* **155**, 768–775.
- 58 Saavedra De Bast M, Mine N & Van Melderen L (2008) Chromosomal toxin-antitoxin systems may act as anti-addiction modules. *J Bacteriol* **190**, 4603–4609.
- 59 Jaffe A, Ogura T & Hiraga S (1985) Effects of the *ccd* function of the F plasmid on bacterial growth. *J Bacteriol* **163**, 841–849.
- 60 Miki T, Park JA, Nagao K, Murayama N & Horiuchi T (1992) Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress *letD* (*ccdB*) product growth inhibition. *J Mol Biol* **225**, 39–52.
- 61 Critchlow SE, O’Dea MH, Howells AJ, Couturier M, Gellert M & Maxwell A (1997) The interaction of the F plasmid killer protein, CcdB, with DNA gyrase: induction of DNA cleavage and blocking of transcription. *J Mol Biol* **273**, 826–839.
- 62 Bernard P, Kezdy KE, Van Melderen L, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN & Couturier M (1993) The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol* **234**, 534–541.
- 63 Ruiz-Echevarria MJ, Gimenez-Gallego G, Sabariego-Jareno R & Diaz-Orejas R (1995) Kid, a small protein of the *parD* stability system of plasmid R1, is an inhibitor of DNA replication acting at the initiation of DNA synthesis. *J Mol Biol* **247**, 568–577.
- 64 Ruiz-Echevarria MJ, de-Torrontegui G, Gimenez-Gallego G & Diaz-Orejas R (1991) Structural and functional comparison between the stability systems *parD* of plasmid R1 and *ccd* of plasmid F. *Mol Genet* **225**, 355–362.

- 65 Hargreaves D, Santos-Sierra S, Giraldo R, Sabariego-Jareño R, de la Cueva-Mendez G, Boelens R, Diaz-Orejas R & Rafferty JB (2002) Structural and functional analysis of the kid toxin protein from *E. coli* plasmid R1. *Structure* **10**, 1425–1433.
- 66 Santos-Sierra S, Lemonnier M, Nunez B, Hargreaves D, Rafferty J, Giraldo R, Andreu JM & Diaz-Orejas R (2003) Non-cytotoxic variants of the Kid protein that retain their auto-regulatory activity. *Plasmid* **50**, 120–130.
- 67 Loris R, Dao-Thi MH, Bahassi EM, Van Melderén L, Poortmans F, Liddington R, Couturier M & Wyns L (1999) Crystal structure of CcdB, a topoisomerase poison from *E. coli*. *J Mol Biol* **285**, 1667–1677.
- 68 Simic M, De Jonge N, Loris R, Vesnaver G & Lah J (2009) Driving forces of gyrase recognition by the addiction toxin CcdB. *J Biol Chem* **284**, 20002–20010.
- 69 Bahassi EM, Salmon MA, Van Melderén L, Bernard P & Couturier M (1995) F plasmid CcdB killer protein: *ccdB* gene mutants coding for non-cytotoxic proteins which retain their regulatory functions. *Mol Microbiol* **15**, 1031–1037.
- 70 Dao-Thi MH, Van Melderén L, De Genst E, Afif H, Buts L, Wyns L & Loris R (2005) Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB. *J Mol Biol* **348**, 1091–1102.
- 71 Smith AB & Maxwell A (2006) A strand-passage conformation of DNA gyrase is required to allow the bacterial toxin, CcdB, to access its binding site. *Nucleic Acids Res* **34**, 4667–4676.
- 72 Santos-Sierra S, Pardo-Abarrio C, Giraldo R & Diaz-Orejas R (2002) Genetic identification of two functional regions in the antitoxin of the *parD* killer system of plasmid R1. *FEMS Microbiol Lett* **206**, 115–119.
- 73 Bernard P & Couturier M (1991) The 41 carboxy-terminal residues of the miniF plasmid CcdA protein are sufficient to antagonize the killer activity of the CcdB protein. *Mol Gen Genet* **226**, 297–304.
- 74 Salmon MA, Van Melderén L, Bernard P & Couturier M (1994) The antidote and autoregulatory functions of the F plasmid CcdA protein: a genetic and biochemical survey. *Mol Gen Genet* **244**, 530–538.
- 75 Kamphuis MB, Monti MC, van den Heuvel RH, Santos-Sierra S, Folkers GE, Lemonnier M, Diaz-Orejas R, Heck AJ & Boelens R (2007) Interactions between the toxin kid of the bacterial *parD* system and the antitoxins Kis and MazE. *Proteins* **67**, 219–231.
- 76 Raumann BE, Rould MA, Pabo CO & Sauer RT (1994) DNA recognition by beta-sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature* **367**, 754–757.
- 77 Phillips SE (1994) The beta-ribbon DNA recognition motif. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**, 671–701.
- 78 Oberer M, Zangger K, Gruber K & Keller W (2007) The solution structure of ParD, the antidote of the ParDE toxin antitoxin module, provides the structural basis for DNA and toxin binding. *Protein Sci* **16**, 1676–1688.
- 79 Dalton KM & Crosson S (2010) A conserved mode of protein recognition and binding in a ParD-ParE toxin-antitoxin complex. *Biochemistry* **49**, 2205–2215.
- 80 Phillips SE, Manfield I, Parsons I, Davidson BE, Rafferty JB, Somers WS, Margarita D, Cohen GN, Saint-Girons I & Stockley PG (1989) Cooperative tandem binding of Met repressor of *Escherichia coli*. *Nature* **341**, 711–715.
- 81 Breg JN, van Opheusden JH, Burgering MJ, Boelens R & Kaptein R (1990) Structure of Arc repressor in solution: evidence for a family of beta-sheet DNA-binding proteins. *Nature* **346**, 586–589.
- 82 Madl T, Van Melderén L, Mine N, Respondek M, Oberer M, Keller W, Khatai L & Zangger K (2006) Structural basis for nucleic acid and toxin recognition of the bacterial antitoxin CcdA. *J Mol Biol* **364**, 170–185.
- 83 Somers WS & Phillips SE (1992) Crystal structure of the Met repressor-operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by beta-strands. *Nature* **359**, 387–393.
- 84 Kumar P, Issac B, Dodson EJ, Turkenburg JP & Mande SC (2008) Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* YefM antitoxin reveals that it is not an intrinsically unstructured protein. *J Mol Biol* **383**, 482–493.
- 85 Cherny I & Gazit E (2004) The YefM antitoxin defines a family of natively unfolded proteins: implications as a novel antibacterial target. *J Biol Chem* **279**, 8252–8261.
- 86 Kamada K, Hanaoka F & Burley SK (2003) Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol Cell* **11**, 875–884.
- 87 Van Melderén L, Bernard P & Couturier M (1994) Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Mol Microbiol* **11**, 1151–1157.
- 88 Van Melderén L, Thi MH, Lecchi P, Gottesman S, Couturier M & Maurizi MR (1996) ATP-dependent degradation of CcdA by Lon protease. Effects of secondary structure and heterologous subunit interactions. *J Biol Chem* **271**, 27730–27738.
- 89 De Jonge N, Garcia-Pino A, Buts L, Haesaerts S, Charlier D, Zangger K, Wyns L, De Greve H & Loris R (2009) Rejuvenation of CcdB-poisoned gyrase by an intrinsically disordered protein domain. *Mol Cell* **35**, 154–163.
- 90 Ruiz-Echevarria MJ, Berzal-Herranz A, Gerdes K & Diaz-Orejas R (1991) The *kis* and *kid* genes of the *parD* maintenance system of plasmid R1 form an operon that is autoregulated at the level of transcription by the co-ordinated action of the Kis and Kid proteins. *Mol Microbiol* **5**, 2685–2693.

- 91 Monti MC, Hernandez-Arriaga AM, Kamphuis MB, Lopez-Villarejo J, Heck AJ, Boelens R, Diaz-Orejas R & van den Heuvel RH (2007) Interactions of Kid-Kis toxin-antitoxin complexes with the *parD* operator-promoter region of plasmid R1 are piloted by the Kis antitoxin and tuned by the stoichiometry of Kid-Kis oligomers. *Nucleic Acids Res* **35**, 1737–1749.
- 92 Lah J, Marianovsky I, Glaser G, Engelberg-Kulka H, Kinne J, Wyns L & Loris R (2003) Recognition of the intrinsically flexible addiction antidote MazE by a dromedary single domain antibody fragment. Structure, thermodynamics of binding, stability, and influence on interactions with DNA. *J Biol Chem* **278**, 14101–14111.
- 93 Marianovsky I, Aizenman E, Engelberg_Kulka H & Glaser G (2001) The regulation of the *Escherichia coli* *mazEF* promoter involves an unusual alternating palindromic. *J Biol Chem* **276**, 5975–5984.
- 94 Ruiz-Echevarria MJ, de-la-Cueva G & Diaz-Orejas R (1995) Translational coupling and limited degradation of a polycistronic messenger modulate differential gene expression in the *parD* stability system of plasmid R1. *Mol Gen Genet* **248**, 599–609.
- 95 Kedzierska B, Lian LY & Hayes F (2007) Toxin-antitoxin regulation: bimodal interaction of YefM-YoeB with paired DNA palindromes exerts transcriptional autorepression. *Nucleic Acids Res* **35**, 325–339.
- 96 Overgaard M, Borch J, Jorgensen MG & Gerdes K (2008) Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Mol Microbiol* **69**, 841–857.
- 97 Afif H, Allali N, Couturier M & Van Melderen L (2001) The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the *ccd* poison-antidote system. *Mol Microbiol* **41**, 73–82.
- 98 Dao-Thi MH, Charlier D, Loris R, Maes D, Messens J, Wyns L & Backmann J (2002) Intricate interactions within the *ccd* plasmid addiction system. *J Biol Chem* **277**, 3733–3742.
- 99 Potrykus K, Santos S, Lemonnier M, Diaz-Orejas R & Wegrzyn G (2002) Differential effects of Kid toxin on two modes of replication of lambdoid plasmids suggest that this toxin acts before, but not after, the assembly of the replication complex. *Microbiology* **148**, 2489–2495.
- 100 De la Cueva-Mendez G (2000) Inhibición de proliferación celular en eucariotas y activación de apoptosis en células humanas mediante el control transcripcional independiente de los genes procariotas *kis* y *kid*. Análisis del mecanismo de acción e implicaciones en terapia. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.
- 101 Pedersen K, Christensen SK & Gerdes K (2002) Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol Microbiol* **45**, 501–510.
- 102 Pedersen K, Zavialov AV, Pavlov MY, Elf J, Gerdes K & Ehrenberg M (2003) The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* **112**, 131–140.
- 103 Hayes CS & Sauer RT (2003) Cleavage of the A site mRNA codon during ribosome pausing provides a mechanism for translational quality control. *Mol Cell* **12**, 903–911.
- 104 Neubauer C, Gao YG, Andersen KR, Dunham CM, Kelley AC, Hentschel J, Gerdes K, Ramakrishnan V & Brodersen DE (2009) The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE. *Cell* **139**, 1084–1095.
- 105 Garza-Sanchez F, Shoji S, Fredrick K & Hayes CS (2009) RNase II is important for A-site mRNA cleavage during ribosome pausing. *Mol Microbiol* **73**, 882–897.
- 106 Zhang Y, Zhang J, Hoefflich KP, Ikura M, Qing G & Inouye M (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **12**, 913–923.
- 107 Munoz-Gomez AJ, Lemonnier M, Santos-Sierra S, Berzal-Herranz A & Diaz-Orejas R (2005) RNase/anti-RNase activities of the bacterial *parD* toxin-antitoxin system. *J Bacteriol* **187**, 3151–3157.
- 108 Zhang J, Zhang Y, Zhu L, Suzuki M & Inouye M (2004) Interference of mRNA function by sequence-specific endoribonuclease PemK. *J Biol Chem* **279**, 20678–20684.
- 109 Kamphuis MB, Bonvin AM, Monti MC, Lemonnier M, Munoz-Gomez A, van den Heuvel RH, Diaz-Orejas R & Boelens R (2006) Model for RNA binding and the catalytic site of the RNase Kid of the bacterial *parD* toxin-antitoxin system. *J Mol Biol* **357**, 115–126.
- 110 Diago-Navarro E, Kamphuis MB, Boelens R, Barendregt A, Heck AJ, van den Heuvel RH & Diaz-Orejas R (2009) A mutagenic analysis of the RNase mechanism of the bacterial Kid toxin by mass spectrometry. *FEBS J* **276**, 4973–4986.
- 111 Zhang Y, Zhu L, Zhang J & Inouye M (2005) Characterization of ChpBK, an mRNA interferase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**, 26080–26088.
- 112 Zavialov AV, Mora L, Buckingham RH & Ehrenberg M (2002) Release of peptide promoted by the GGQ motif of class 1 release factors regulates the GTPase activity of RF3. *Mol Cell* **10**, 789–798.
- 113 Diago-Navarro E, Mora L, Buckingham RH, Diaz-Orejas R & Lemonnier M (2009) Novel *Escherichia coli* RF1 mutants with decreased translation termination activity and increased sensitivity to the cytotoxic effect of the bacterial toxins Kid and RelE. *Mol Microbiol* **71**, 66–78.
- 114 Diego Navarro E (2009) Evaluación del mecanismo de corte del RNA por la toxina bacteriana Kid y de su actividad inhibidora de la traducción. PhD Thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

- 115 Staudenbauer WL (1978) Structure and replication of the colicin E1 plasmid. *Curr Top Microbiol Immunol* **83**, 93–156.
- 116 Wegrzyn A, Wegrzyn G & Taylor K (1995) Protection of coliphage lambda O initiator protein from proteolysis in the assembly of the replication complex in vivo. *Virology* **207**, 179–184.
- 117 Johnson SK, Bhattacharyya S & Griep MA (2000) DnaB helicase stimulates primer synthesis activity on short oligonucleotide templates. *Biochemistry* **39**, 736–744.
- 118 de la Cueva-Mendez G, Mills AD, Clay-Farrace L, Diaz-Orejas R & Laskey RA (2003) Regulatable killing of eukaryotic cells by the prokaryotic proteins Kid and Kis. *EMBO J* **22**, 246–251.
- 119 Kristoffersen P, Jensen GB, Gerdes K & Piskur J (2000) Bacterial toxin-antitoxin gene system as containment control in yeast cells. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5524–5526.
- 120 Yamamoto TA, Gerdes K & Tunnacliffe A (2002) Bacterial toxin RelE induces apoptosis in human cells. *FEBS Lett* **519**, 191–194.
- 121 Slanchev K, Stebler J, de la Cueva-Mendez G & Raz E (2005) Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 4074–4079.
- 122 Nehlsen K, Herrmann S, Zauers J, Hauser H & Wirth D (2009) Toxin-antitoxin based transgene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **38**, E32.
- 123 Gabant P, Van Reeth T, Dreze PL, Faelen M, Szpirer C & Szpirer J (2000) New positive selection system based on the *parD* (*kis/kid*) system of the R1 plasmid. *BioTechniques* **28**, 784–788.
- 124 Bernard P, Gabant P, Bahassi EM & Couturier M (1994) Positive-selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene. *Gene* **148**, 71–74.
- 125 Walhout AJ, Temple GF, Brasch MA, Hartley JL, Lorson MA, van den Heuvel S & Vidal M (2000) GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol* **328**, 575–592.
- 126 Le Roux F, Binesse J, Saulnier D & Mazel D (2007) Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol* **73**, 777–784.
- 127 Mondon P, Chang YC, Varma A & Kwon-Chung KJ (2000) A novel episomal shuttle vector for transformation of *Cryptococcus neoformans* with the *ccdB* gene as a positive selection marker in bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **187**, 41–45.
- 128 Szpirer CY & Milinkovitch MC (2005) Separate-component-stabilization system for protein and DNA production without the use of antibiotics. *BioTechniques* **38**, 775–781.
- 129 Stieber D, Gabant P & Szpirer C (2008) The art of selective killing: plasmid toxin/antitoxin systems and their technological applications. *BioTechniques* **45**, 344–346.
- 130 Suzuki M, Zhang J, Liu M, Woychik NA & Inouye M (2005) Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase. *Mol Cell* **18**, 253–261.
- 131 Nieto C, Pellicer T, Balsa D, Christensen SK, Gerdes K & Espinosa M (2006) The chromosomal *relBE2* toxin-antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae*: characterization and use of a bioluminescence resonance energy transfer assay to detect toxin-antitoxin interaction. *Mol Microbiol* **59**, 1280–1296.
- 132 Liou VS, Rey O, Balsa D, Pellicer T & Alonso JC (2010) A toxin-antitoxin module as a target for antimicrobial development. *Plasmid* **63**, 31–39.
- 133 Sat B, Reches M & Engelberg-Kulka H (2003) The *Escherichia coli mazEF* suicide module mediates thymineless death. *J Bacteriol* **185**, 1803–1807.
- 134 Trovatti E, Cotrim CA, Garrido SS, Barros RS & Marchetto R (2008) Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 6161–6164.
- 135 De Lano WL (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- 136 Koradi R, Billeter M & Wuthrich K (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* **14**, 51–55.
- 137 Gottfredsen M & Gerdes K (1998) The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol Microbiol* **29**, 1065–1076.
- 138 Li GY, Zhang Y, Inouye M & Ikura M (2009) Inhibitory mechanism of *Escherichia coli* RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site. *J Biol Chem* **284**, 14628–14636.
- 139 Roberts RC & Helinski DR (1992) Definition of a minimal plasmid stabilization system from the broad-host-range plasmid RK2. *J Bacteriol* **174**, 8119–8132.
- 140 Black DS, Kelly AJ, Mardis MJ & Moyed HS (1991) Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol* **173**, 5732–5739.
- 141 Schumacher MA, Piro KM, Xu W, Hansen S, Lewis K & Brennan RG (2009) Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* **323**, 396–401.
- 142 Poulsen LK, Larsen NW, Molin S & Andersson P (1992) Analysis of an *Escherichia coli* mutant strain resistant to the cell-killing function encoded by the *gef* gene family. *Mol Microbiol* **6**, 895–905.